UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE NANTES

ANNÉE 1967-1968

N°7

Première Thèse :

CONTRIBUTION A L'IDENTIFICATION ET AU DOSAGE PAR SPECTROMÉTRIE INFRAROUGE DE QUELQUES TOXIQUES ORGANIQUES NON VOLATILS EXTRAITS DES MILIEUX BIOLOGIQUES

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté

MENTION TRÈS HONORABLE
avec félicitations du jury,
proposition d'impression aux frais
de l'Etat et avis favorable pour
l'échange avec les Universités
et les Facultés étrangères

THÈSES

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

Présentées et soutenues publiquement

le 21 mai 1968

par

Henri CORNETEAU

né le 3 décembre 1927 à PAULX (L-A)

Pharmacien

Licencié ès Sciences Physiques

Chef de Travaux à la Faculté

Membres du Jury : Monsieur le Professeur MONNET Président
Monsieur le Professeur ROUZET Juge
Monsieur le Professeur BOITEAU Juge

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555419_0018

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE NANTES

ANNÉE 1967-1968

N°7

Première Thèse :

CONTRIBUTION A L'IDENTIFICATION ET AU DOSAGE PAR SPECTROMÉTRIE INFRAROUGE DE QUELQUES TOXIQUES ORGANIQUES NON VOLATILS EXTRAITS DES MILIEUX BIOLOGIQUES

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté

MENTION TRÈS HONORABLE
avec félicitations du jury,
proposition d'impression aux frais
de l'Etat et avis favorable pour
l'échange avec les Universités
et les Facultés étrangères

THÈSES

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

Présentées et soutenues publiquement

le 21 mai 1968

par

Henri CORNETEAU

né le 3 décembre 1927 à PAULX (L-A)

Pharmacien

Licencié ès Sciences Physiques

Chef de Travaux à la Faculté

Membres du Jury : Monsieur le Professeur MONNET Président
Monsieur le Professeur ROUZET Juge
Monsieur le Professeur BOITEAU Juge

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

DE NANTES

Doyens honoraires de la Faculté : MM. AUVIGNE , BOQUIEN

Professeurs honoraires de l'Ecole de Plein Exercice, de l'Ecole Nationale et de la Faculté :

MM. DALLONGEVILLE, GIROIRE, GUERITHAULT, GUEGUEN, LEROUX, PERRIN, PICARD

- - - - - - - - -

Doyen : M. J.P. KERNEIS Assesseurs : MM. A. FOUCAUD, E. CORNET

- - - - - - - - -

PROFESSEURS TITULAIRES DE CHAIRE

MM.	
F. BARON	O. R. L.
S. BERNARD	Biochimie médicale
Y. BOQUIEN	Clinique médicale B
R. BUREAU	Clinique chirurgicale infantile et Orthopédique
Y. BUREAU	Clinique dermatologique
J. DELAIRE	Clinique stomatologique
E. CORNET	Clinique chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
P. DESCUNS	Clinique neuro-chirurgicale
L. DUMORTIER	Médecine sociale et Médecine du travail
A. FOUCAUD	Botanique et Cryptogamie
J. GRISLAIN	Clinique médicale infantile
R. GUIHARD	Physique
J. GUILLON	Pathologie médicale
J. HOREAU	Clinique médicale A
P. HOULNE	Clinique obstétricale
J.P. KERNEIS	Anatomie pathologique
J. LEGRAND	Clinique ophtalmologique
E.P. LOSSOUARN	Chimie pharmaceutique
P. MALVY	Pathologie chirurgicale
R. MONNET	Matière médicale et Pharmacologie
M. MOUSSEAU	Clinique chirurgicale
M. NEDELEC	Clinique urologique
J. PLOQUIN	Pharmacie chimique
M. ROUZET	Pharmacie galénique
J. SOURDILLE	Clinique traumatologique
Y. STEPHAN	Pharmacodynamie et Chimie Biologique Pharmaceutique
J. TUSQUES	Histologie et Embryologie
P. VERAN	Thérapeutique
C. VERMEIL	Parasitologie et Pathologie exotique
F. VIOLETTE	Physiologie

PROFESSEURS TITULAIRES A TITRE PERSONNEL

MM.

F. GILLOT	Pédiatrie
P. MINICONI	Médecine générale
Mme MUSSINI - MONTPELLIER	Anatomie Pathologique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.

J. BARBIN	Anatomie
H. BARRIERE	Dermatologie
J. GOUIN	Orthopédie
D. GUIHARD	Physique
F. HERVOUET	Ophtalmologie
E. PICHAT	Anatomie

PROFESSEUR ASSOCIE

M. DILENGE D.	Neuro-Radiologie

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

MM.

L. BODIC (f.f.)	Médecine générale
H. BOITEAU	Toxicologie
A. CATTAN	Cancérologie
A. CHARBONNEL	Neurologie
M. COLLET	Neuro-Chirurgie
J. CORROLLER	Pneumo-Phtisiologie
S. COTTIN	Médecine générale et Thérapeutique
A. COURTIER	Bactériologie
H. DUPON	Chirurgie thoracique et Cardiovasculaire
A. GAILLARD	Stomatologie
P. GALLE	Physique Biologique
J.D. GINET	Physiologie
J. GUENEL	Médecine générale
D. HERVOUET	Médecine générale

Mme A.M. HERZOG (f.f.)	Electroradiologie
B. HERZOG	Electroradiologie
G. LEFRANC (f.f.)	Histologie et Embryologie
F. LEGENT (f.f.)	O. R. L.
M. LERAT	Obstétrique
Y. MADEC (f.f.)	Biochimie médicale
R. MAINARD	Clinique médicale infantile
Ch. MOIGNETEAU	Pneumo-Phtisiologie
Mme F. NICOLAS	Anesthésiologie
G. NICOLAS	Médecine légale
P. OUDEA	Médecine générale et Thérapeutique
Mme Y. DE ROECK	Pharmacie galénique
Ch. ROUSSEAU (f.f.)	Sciences Naturelles
J. TARDIVEAU	Electroradiologie
P. VERCELLETTO (f.f.)	Neurologie
L. WELIN	Pharmacodynamie

AGREGES EN EXERCICE

MM.

J. AUVIGNE	Urologie
A. SILVESTRE DE FERRON	Chirurgie générale

Secrétaire de la Faculté	M. E. BOULESTEIX
Conservateur de la Bibliothèque de l'Université	Mme GALKOWSKI

Par délibération en date du 7 Mars 1962, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation , ni improbation .

A ma femme.

A mes enfants
Anne et Maryvonne.

A Monsieur M. S C H M I T T

Recteur de l'Académie de Nantes

A Monsieur le Professeur J. P. K E R N E I S

Doyen de la Faculté Mixte de Médecine
et de Pharmacie de Nantes

En hommage respectueux.

A notre Jury de Thèse

Monsieur le Professeur R. M O N N E T

Professeur de Matière Médicale et Pharmacologie

Qui nous fait l'honneur de présider le Jury de notre Thèse . Il nous a donné les moyens de réaliser ce travail qu'il a constamment suivi de sa bienveillante sollicitude .
Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur M. R O U Z E T

Professeur de Pharmacie Galénique

Qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire, et suivre nos travaux avec un intérêt constant.
Avec l'expression de notre sincère gratitude.

Monsieur le Professeur H. B O I T E A U

Professeur sans Chaire (Toxicologie)

Qui nous a inspiré le sujet de cette Thèse et nous a constamment prodigué ses précieux conseils et ses encouragements au cours de ce travail.
Qu'il soit assuré de notre vive reconnaissance.

A Monsieur le Professeur M. D A L L O N G E V I L L E

Professeur Honoraire

Qui nous a confié un poste d'Assistant de Physique
dans son service, qui nous a toujours témoigné
une bienveillante sollicitude.
Avec l'expression de notre respectueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur A. F O U C A U D

Premier Assesseur du Doyen

En remerciement pour ses enseignements et pour
l'intérêt qu'il nous a manifesté et
en témoignage de profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur J. P L O Q U I N

Professeur de Pharmacie Chimique

Qui nous a fait bénéficier de l'immense
richesse de son expérience scientifique.
Avec l'assurance de notre sincère attachement.

A Messieurs les Professeurs R. et D. G U I H A R D

Professeurs de Physique

Qui nous ont toujours prodigué de précieux conseils.
En témoignage de reconnaissance .

A Monsieur le Professeur R. F R E Y M A N N

Professeur à la Faculté des Sciences de Paris

Dont l'enseignement magistral nous a profondément marqué en nous donnant le goût de la recherche et le désir de nous consacrer à la Spectrométrie.

A Monsieur le Professeur A. B O U L L O U D

Professeur de Physique à la Faculté des Sciences de Nantes

Qui a guidé nos premiers pas de jeune assistant à la Faculté des Sciences. Avec l'assurance de notre fidèle souvenir et de nos sentiments dévoués.

A Monsieur le Professeur B. W O J T K O W I A K

Professeur de Chimie à la Faculté des Sciences de Nantes

Qui nous a été d'un précieux secours dans la réalisation de ce travail par sa très haute compétence dans les problèmes de Spectrométrie infra-rouge et nous a toujours accueilli avec une délicate cordialité. Avec l'expression de notre gratitude.

A nos Maîtres de la Faculté des Sciences de Rennes et de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Nantes

En témoignage de reconnaissance.

A nos camarades des laboratoires de Physique, de Toxicologie et de Pharmacie Galénique de la Faculté

Amicalement.

Aux Directeurs, Ingénieurs et Techniciens de la Société ERNST LEITZ auprès desquels nous avons rencontré à Wetzlar un chaleureux accueil et un intérêt constant

Avec nos remerciements.

A Madame L E R A Y et à Mademoiselle B O U S S I C A U L T du laboratoire de Toxicologie

Que nous remercions pour leur collaboration technique.

INTRODUCTION

L'identification et le dosage des toxiques organiques non volatils extraits des milieux biologiques constituent depuis longtemps les plus complexes et les plus délicats des problèmes analytiques qui se posent aux toxicologues. Aujourd'hui , les difficultés qui entourent ces déterminations ne cessent de s'accroître du fait de la multiplicité des produits de synthèse qui apparaissent presque quotidiennement sous la forme de médicaments ou de produits phytosanitaires.

Aux anciennes méthodes d'identification et de dosage , basées sur les réactions de précipitation ou de coloration,ou sur l'examen micrographique , sont venues s'ajouter depuis quelques années des méthodes physiques telles que la spectrométrie d'absorption dans l'ultraviolet ou dans l'infrarouge , la chromatographie en phase gazeuse , la spectrométrie de masse ou la diffraction des rayons X.

La spectrométrie d'absorption est la plus couramment utilisée . Mais , si la spectrométrie ultraviolette peut rendre de grands services pour le dosage de certains toxiques organiques , du fait de sa sensibilité , elle ne possède pas une spécificité suffisante pour permettre d'effectuer une identification précise et sûre . En outre , elle ne peut pas être tenue pour une méthode générale , car tous les toxiques n'absorbent pas les radiations ultraviolettes.

Par contre, pratiquement tous les toxiques organiques possèdent un spectre infrarouge caractéristique . La spécificité de ce spectre est si grande que certains auteurs n'hésitent pas à lui accorder comme moyen d'identification , une valeur comparable à celle des empreintes digitales chez l'Homme . Aussi , à l'heure actuelle , la spectrométrie infrarouge apparaît-elle comme la méthode de choix pour identifier un toxique organique d'une manière indiscutable .

Tous les procédés d'identification sont plus ou moins perturbés par les impuretés qui accompagnent , souvent en proportions importantes , les toxiques organiques non volatils extraits des milieux biologiques . La spectrométrie infrarouge n'échappe pas à cet inconvénient et unspectre de toxique n'est interprétable que s'il a été enregistré sur un produit préalablement purifié . L'influence perturbatrice des impuretés se manifeste avec une acuité particulière lorsqu'il s'agit d'effectuer des dosages et il semble que cet obstacle ait retardé l'application de la spectrométrie infrarouge à l'analyse quantitative en Toxicologie .

Les méthodes chromatographiques sur papier , sur couche mince ou en phase vapeur sont celles qui offrent les meilleures possibilités pour réaliser la séparation efficace de très faibles quantités de produits , De tous les procédés , la chromatographie sur couche mince de silice nous a paru le plus rapide et le plus aisé à mettre en oeuvre .

En entreprenant ce travail , notre but a donc été d'étudier une méthode qui permette simultanément d'identifiër et de doser par la spectrométrie infrarouge les toxiques organiques non volatils extraits des milieux biologiques , après les avoir préalablement purifiés par chromatographie sur couche mince de silice .

- I -

GENERALITES

SUR LES

SPECTRES INFRAROUGES

Un spectre infrarouge est habituellement tracé entre 2 et 15 microns , dans la région spectrale dite "du chlorure de sodium". Il présente des bandes d'absorption dont le nombre et l'intensité varient en fonction de la structure moléculaire du corps examiné. En général , ces bandes sont suffisamment nombreuses pour donner au spectre une complexité qui lui confère sa spécificité.

1 - SPECIFICITE

On peut démontrer que le spectre infrarouge d'un corps est spécifique :

si l'on considère le mouvement harmonique d'un atome de masse m_i à la fréquence υ en fonction du temps t, le déplacement s_i sera donné par la formule :

$$s_i = s_{i_o} \cos (2\pi\upsilon t + \phi)$$

et si on désigne par b_i l'accélération, on a :

$$b_i = - 4 \pi^2 \upsilon^2 s_i$$

la force F_i mise en jeu sera égale à :

$$F_i = m_i b_i = - 4 \pi^2 \upsilon^2 m_i s_i$$

Cette force F_i rapportée à un trièdre de référence x, y, z, s'exprimera de la manière suivante :

$$F_x^1 = - K_{xx}^{11} x_1 - K_{xy}^{11} y_1 - K_{xz}^{11} z_1$$

$$F_y^1 = - K_{yx}^{11} x_1 - K_{yy}^{11} y_1 - K_{yz}^{11} z_1$$

$$F_z^1 = - K_{zx}^{11} x_1 - K_{zy}^{11} y_1 - K_{zz}^{11} z_1$$

Dans le cas des N atomes d'une molécule polyatomique, et, en considérant seulement les vibrations fondamentales, nous serons en présence des forces

F^1, F^2, F^3, ... , F^n .

Le système d'équations reliant les forces entre elles sera de la forme :

$$F_x^1 = - K_{xx}^{11} x_1 - K_{xy}^{11} y_1 - K_{xz}^{11} z_1 - K_{xx}^{12} x_2 - K_{xy}^{12} y_2 - \cdots\cdots - K_{xz}^{1n} z_n$$

$$F_y^1 = - K_{yx}^{11} x_1 - K_{yy}^{11} y_1 - K_{yz}^{11} z_1 - K_{yx}^{12} x_2 - K_{yy}^{12} y_2 - \cdots\cdots - K_{yz}^{1n} z$$

$$F = - K \quad x$$

$$F_z^n = - K_{zx}^{n1} x_1 - K_{zy}^{n1} y_1 - K_{zz}^{n1} z_1 - K_{zx}^{n2} x_2 - K_{zy}^{n2} y_2 - \cdots\cdots - K_{zz}^{nn} z_n$$

L'examen du déterminant de ce système montre que tout déplacement d'un atome dans la molécule entraîne une variation des forces F^1 , F^2 , F^3 , ... , F^n , et partant des valeurs υ_1 , υ_2 ,...., υ_n. Par conséquent , un spectre de vibration ne peut correspondre qu'à une seule molécule . Toute modification dans la structure de l'édifice moléculaire détermine une variation d'une ou de plusieurs fréquences , qui peut être très faible,si un seul atome est en cause , beaucoup plus importante , parfois considérable , si la modification porte sur un radical entier .

On peut donc s'attendre à ce que des molécules de structure voisine fournissent des spectres infrarouges très différents .C'est le cas , par exemple , de la strychnine et de la brucine ou encore de l'atropine et de la scopolamine .

L'expérience est venue confirmer ces considérations théoriques . L'examen des quatre-vingt mille spectres infrarouges qui exis-

tent dans les fichiers (SADTLER , IBM , DMS , ... etc.) montre qu'il y a fort peu de spectres semblables . Seules les très faibles variations de fréquence peuvent ne pas être décelées , soit que les appareils manquent de précision , soit , le plus souvent , qu'ils ne possèdent pas une définition suffisante pour résoudre les systèmes de bandes d'absorption très proches les unes des autres . Il faut d'ailleurs souligner que les conditions favorables à la résolution de tels systèmes ne sont pas toujours faciles à réaliser ; Comme exemple , on peut citer les hydrocarbures alphatiques à longue chaîne , qui , au dessus d'un certain nombre d'atomes de carbone donnent des spectres infrarouges pratiquement semblables . Mais ces cas sont relativement rares et ne se rencontrent pas dans le domaine qui fait l'objet de notre travail .

2 - F I D E L I T E

Un même échantillon d'un produit fournit des spectres qui sont rigoureusement reproductibles quant à la position des bandes et à leur intensité , à la condition que les réglages de l'appareil ne soient pas modifiés . Par contre , les spectres de plusieurs échantillons d'un même produit à la même concentration peuvent présenter des variations d'intensité , qui dépendent de leur préparation , surtout lorsque les mesures sont effectuées en milieu solide , selon la technique des pastilles de bromure de potassium . Ces variations dépendent pour une large part de l'habileté du manipulateur .

3 - SENSIBILITE

La spectrométrie infrarouge n'a pas la réputation d'être une méthode très sensible . Cependant , il faut tenir compte de l'amélioration des performances des appareils consécutive aux progrès techniques et de l'existence de dispositifs accessoires tels que microscopes ou expanseurs d'échelle qui peuvent eux aussi améliorer ces performances. Ainsi , on peut couramment obtenir un spectre infrarouge avec des quantités de produit de l'ordre de 0,5 à 2,0 mg (5) . Mais certains réducteurs des faisceaux appelés également microscopes infrarouges permettent d'opérer sur quelques microgrammes (17) . Il ne faut pas oublier non plus que la limite de détection d'une substance varie selon la nature de son spectre et qu'elle doit être déterminée expérimentalement dans chaque cas (3) .

La présence de substances étrangères , communément désignés sous le nom " d'impuretés " , peut amener des perturbations importantes dans un spectre , surtout si ces dernières existent dans l'échantillon en proportions élevées par rapport à la quantité de produit examiné . Cette influence se traduit généralement par une augmentation du fond spectral (3) et par l'apparition de bandes d'absorption parasites , qui , selon leur position , peuvent masquer plus ou moins les bandes du produit analysé . Dans les cas les plus défavorables , lorsque la quantité d'impuretés dépasse celle du produit , le spectre peut être transformé au point de devenir inutilisable . Une proportion moindre d'impuretés peut permettre une caractérisation , mais elle rend impossible

les déterminations quantitatives (3) . Enfin , on considère généralement qu'un très faible pourcentage d'impuretés , de l'ordre de 5 p. 100, ne modifie pas les spectres d'une manière appréciable et ne gêne ni l'interprétation , ni le dosage dans la plupart des cas .

Le degré de pureté de l'échantillon est donc capital en ce qui concerne la sensibilité de la méthode spectrométrique infrarouge . Si les produits chimiques industriels ou médicamenteux sont , en général , suffisamment purs pour pouvoir être examinés sans difficultés , il en va autrement des toxiques organiques non volatils extraits des milieux biologiques , qui sont toujours accompagnés d'une grande quantité d'impuretés . L'utilisation de la spectrométrie infrarouge en Toxicologie est donc conditionnée par une purification préalable , aussi poussée que possible , des produits à identifier et à doser .

Ce bref examen des principaux caractères des spectres infrarouges fait ressortir les différences qui les distinguent des spectres enregistrés dans l'ultraviolet . Ces derniers présentent le plus souvent une faible spécificité , du fait de leur nombre réduit de bandes d'absorption . Contrairement aux spectres infrarouges , qui dans la région comprise entre 2 et 15 μ sont principalement des spectres de vibration et de vibration-rotation , les spectres d'absorption dans l'ultraviolet sont des spectres électroniques dont le tracé est l'enveloppe des N fréquences correspondant aux N états électroniques des atomes . Le manque de spécificité de ces spectres provient aussi des difficultés rencontrées pour situer avec précision la position des maximum d'absorption du fait que les

bandes sont larges et présentent des sommets arrondis qui ne peuvent être définis qu'à 5 ou 10 Å près . Seuls les composés gazeux ou à l'état de vapeur fournissent des spectres ultraviolets dont les bandes sont suffisamment fines pour qu'il soit possible de déterminer avec précision la position de leur maximum .

Par ailleurs , la spectrométrie ultraviolette est d'un emploi moins général que la spectrométrie infrarouge , tous les corps n'absorbant pas les radiations comprises entre 2.200 et 3.000 Å . Cet inconvénient peut d'ailleurs devenir un avantage dans la mesure où les impuretés qui accompagnent les toxiques organiques isolés des milieux biologiques ne présentent pas de bandes d'absorption dans cette région du spectre .

Par contre , l'absorption dans le proche ultraviolet étant souvent intense , la spectrométrie ultraviolette peut présenter une sensibilité parfois très élevée .

La spectrométrie infrarouge apparaît donc comme une méthode plus générale et plus sûre que la spectrométrie ultraviolette car elle permet d'identifier et de doser pratiquement tous les composés organiques d'une manière spécifique . Toutefois , dans certains cas particuliers la spectrométrie ultraviolette permet d'opérer avec une meilleure sensibilité .

- II -

APPLICATIONS DE LA SPECTROMETRIE INFRAROUGE A L'ANALYSE TOXICOLOGIQUE

1 - EXPOSE DES METHODES

Plusieurs auteurs ont déjà utilisé la spectrométrie infrarouge pour identifier , et éventuellement doser , des produits toxiques qu'ils avaient extraits des milieux biologiques tels que le sang , les viscères ou diverses denrées alimentaires . Une revue des principales applications de la spectrométrie infrarouge en Toxicologie a d'ailleurs été publiée récemment par MESTRE , JAULMES et SABON (26) .

Toutes les méthodes employées commencent , bien entendu , par l'extraction des toxiques suivant l'une des techniques

classiques . Puis , étant donné la nécessité de débarasser les toxiques isolés des impuretés qui les accompagnent , opération dont nous avons déjà souligné l'importance , l'extraction est suivie d'une ou plusieurs purifications qui conduisent à l'obtention d'un résidu qui est examiné par spectrométrie infrarouge .

L'examen peut se faire en phase liquide , après dissolution du résidu dans l'un des solvants habituellement utilisés pour cet usage (sulfure de carbone , tétrachlorure de carbone , chloroforme , éther de pétrole) . ALHA et TAMMINEN (12) ainsi que LINFORS et RUOHONEN (24) identifient par cette méthode des toxiques , principalement des hypnotiques , qu'ils ont isolés au cours d'expertises médico-légales . De leur côté , Mac COY et FIEBIG (19) décrivent une microméthode qui permet de mettre en solution dans 4 à 5 µl de sulfure de carbone ou de tétrachlorure de carbone les produits isolés sous forme de spots par chromatographie en couche mince . La solution est ensuite examinée dans l'infrarouge à l'intérieur d'une micro-cellule .

Le résidu obtenu par évaporation des liquides d'extraction peut également être analysé en phase solide , sous la forme d'une pastille dans laquelle il est mélangé à du bromure de potassium . Mais ce procédé comporte une opération particulièrement délicate : celle qui a pour but de transférer le résidu , souvent de très faible importance , sur le bromure de potassium . Plusieurs techniques ont été proposées pour réaliser cette opération . ALHA et TAMMINEN (12) , (37) chauffent le résidu de manière à sublimer les hypnotiques recherchés et à les condenser sur un

disque de bromure de potassium . BONNICHSEN et ses collaborateurs (16) utilisent aussi la technique par sublimation sur disque de bromure de potassium pour identifier de faibles quantités de caféine , d'antipyrine ou de phénacétine isolées par chromatographie sur papier à partir d'extraits de viscères . BRANDENBERGER (18) recourt à une technique analogue pour caractériser des barbituriques extraits de milieux biologiques , mais il accroît la sensibilité du procédé en utilisant une méthode de micropastillage , à l'aide d'un support constitué par un disque de plomb perforé . L'auteur parvient ainsi à enregistrer un spectre de barbiturique dans l'infrarouge sur des quantités qui sont de l'ordre de 10 µg . MEBANE (25) a préconisé une technique un peu différente pour déposer le produit à examiner sur le bromure de potassium : il évapore la solution sur une petite quantité de ce sel avec laquelle il confectionne ensuite une pastille . ALHA et TAMMINEN (12) ont appliqué le même procédé à l'expertise médico-légale et DORING et DOERING (20) opèrent de la même façon pour rechercher les résidus d'insecticides organochlorés et organophosphorés sur les fruits et sur les légumes . Dans certains cas , ALHA et TAMMINEN préfèrent simplifier l'opération en évaporant directement la solution sur un disque de bromure de potassium .

SPARAGANA et MASON (34) décrivent un procédé qui leur assure une plus grande sensibilité . Ils procèdent à la lyophilisation d'une solution hydroalcoolique renfermant à la fois le résidu à analyser et du bromure de potassium . Ils parviennent ainsi à enregistrer des spectres infrarouges sur des quantités de produit d'environ 1 µg . Enfin , une technique originale a été proposée récemment par BEYERMANN (14)

pour identifier diverses substances pures , notamment des alcaloïdes , et procéder à leur détermination semi-quantitative sur des quantités allant de 2 à 50 µg de produit . Il évapore la solution sur un miroir de forme appropriée en s'aidant d'un courant d'air chaud , et , pour régulariser le dépôt à la surface du miroir , il imprime à ce dernier une rotation de 150 t / minutes en fin d'évaporation . Il obtient ainsi un dépôt cristallin régulier , qu'il examine par réflexion à l'aide d'un dispositif réducteur de faisceau . Afin de supprimer la diffusion et l'effet Christiansen dus aux microcristaux , BEYERMANN recommande d'utiliser la méthode du film fondu qui consiste , en l'occurence , à chauffer le miroir métallique de manière à fondre la substance qui se solidifie par refroidissement en formant un film continu . BEYERMANN (15) dans une publication récente , indique que cette méthode peut être appliquée au dosage des médicaments anticonceptionnels .

2 - DISCUSSION DES METHODES

A - EN PHASE LIQUIDE

L'enregistrement d'un spectre infrarouge en phase liquide présente plusieurs inconvénients . En premier lieu , il est nécessaire d'examiner les solutions sous une très faible épaisseur , de l'ordre du millimètre , afin de réduire l'absorption propre au solvant . Il est donc indispensable de travailler avec des solutions concentrées . Les quantités de toxique mises en jeu étant généralement très faibles ,

il faut les dissoudre dans un volume de solvant extrêmement réduit ou bien concentrer les solutions . D'autre part , le choix du solvant est imposé par la solubilité du produit à caractériser . Or , il n'y a qu'un petit nombre de solvants qui soient utilisables en spectrométrie infrarouge . Pratiquement , le sulfure de carbone et le tétrachlorure de carbone sont les seuls solvants dont les spectres d'absorption ne comportent qu'un nombre de bandes suffisamment restreint .

Sous une épaisseur de 1 mm , le sulfure de carbone absorbe d'une manière intense les radiations comprises entre 6 et 7 microns (1428 cm^{-1} à 1666 cm^{-1}) et à un degré moindre , celles de la région allant de 11 à 12 microns (833 à 909 cm^{-1}) . Dans les mêmes conditions , le spectre du tétrachlorure de carbone présente une région pratiquement opaque entre 11,5 et 14,5 microns (689 à 869 cm^{-1}) ainsi que plusieurs autres bandes d'absorption importantes dans les régions de 6,5 microns (1538 cm^{-1}) , 8 microns (1250 cm^{-1}) et 10 microns (1000 cm^{-1}) .

Les autres solvants ont des spectres trop complexes pour pouvoir servir à des caractérisations en Toxicologie . L'emploi de la technique par compensation sur le faisceau de référence ne permet guère de remédier à leur absorption propre , car l'énergie résiduelle transmise étant très affaiblie , la sensibilité se trouve considérablement réduite .

B - EN PHASE SOLIDE

L'identification des toxiques par spectrométrie infrarouge en milieu solide ne se heurte pas aux mêmes inconvénients , car le chlorure de sodium et le bromure de potassium habituellement utilisés comme support ou "matrice" sont transparents aux radiations de longueurs d'onde comprises entre 2 et 15 μ . Les difficultés rencontrées sont d'un autre ordre . Elles découlent des précautions qui doivent être respectées pour incorporer de faibles quantités de toxiques au support de bromure de potassium . Lorsque les produits sont déposés sur un disque d'halogénure alcalin , par sublimation ou par évaporation d'une solution , il se dépose à la surface du disque une pellicule non homogène formée de microcristaux de taille irrégulière . Dans ces conditions , les plus gros de ces cristaux , surtout si leur indice de réfraction est élevé , peuvent engendrer un effet de diffusion qui se traduit sur les spectres par un élargissement et une dissymétrie des bandes d'absorption , principalement vers les faibles longueurs d'onde . Les spectres deviennent alors difficilement interprétables . Par ailleurs , les petits cristaux , dont la dimension est du même ordre de grandeur que la longueur d'onde des radiations , surtout si leur indice de réfraction est trop différent de celui de la "matrice" , provoquent l'effet Christiansen (30) qui consiste en un déplacement des bandes . Ces deux phénomènes sont très atténués et deviennent pratiquement négligeables lorsqu'il est possible de broyer très finement les cristaux .

L'existence des difficultés que nous venons de passer en revue explique en partie que les méthodes jusqu'ici proposées soient uniquement qualitatives et ne permettent pas de procéder à de véritables dosages . Seul , BEYERMANN a réalisé des déterminations quantitatives sur des solutions pures , la reproductibilité des résultats varie de 12 à 35 p. 100 pour des quantités de 4 et 10 µg .

- III -

METHODE PROPOSEE

1 - PRINCIPE

En entreprenant ce travail nous nous sommes fixés comme objectif d'étudier la mise au point d'une méthode qui permette d'identifier et de doser , à l'aide de la spectrométrie infrarouge , les toxiques organiques non volatils extraits des milieux biologiques par un procédé classique , tel que celui de STASS-OTTO , et purifiés par une technique chromatographique .

Une identification correcte et un dosage d'une précision acceptable en Toxicologie par une telle méthode suppose , en premier lieu l'existence d'une technique d'examen spectrométrique infrarouge qui échappe le plus possible aux critiques formulées au chapitre précédent.

Après avoir examiné les diverses techniques proposées , nous nous sommes arrêtées à celle de BOEHLER citée par VOLKMANN (38) . Cette technique d'identification en milieu solide est inspirée des travaux de SCHLEDT et REINWEIN (32) et de ceux de STIMSON et O'DONNEL (36) . Elle nous a paru , en effet , être celle qui satisfait le mieux aux impératifs imposés par le but que nous nous étions fixé . Elle permet , grâce à l'emploi d'un moule spécial , d'inclure au centre d'une pastille de bromure de potassium la totalité du produit à examiner mélangé à une petite quantité de ce même sel (18 à 20 mg) sous la forme d'un disque , dont le diamètre ne dépasse pas quelques millimètres . La totalité du produit se trouve par conséquent dans le faisceau optique du dispositif infrarouge , ce qui permet d'envisager la possibilité de détermination quantitatives . Cette technique offre l'avantage d'opérer en milieu solide , dans le bromure de potassium , dépourvu de bandes d'absorption propres et ne présentant , s'il est convenablement purifié et desséché , qu'une absorbance de fond inférieure à 5 p. 100 , sous l'épaisseur utilisée . Nous avons préféré la technique de BOEHLER à d'autres procédés utilisant également le bromure de potassium , notamment celui décrit par STERLING (35) , car ils sont plus compliqués . Ce dernier consiste à percer un trou de 1,5 mm de diamètre dans une pastille de bromure de potassium , à le remplir avec l'échantillon (5 à 30 µg) , mélangé à du bromure de potassium , puis à comprimer l'ensemble .

La technique de BOEHLER permet de préparer des micropastilles parfaitement reproductibles . En outre , elle évite les phénomènes de diffusion et l'effet Christiansen , car le produit et le

bromure de potassium ont subi ensemble une trituration prolongée et formant une poudre très fine et homogène .

Mais la préparation des micropastilles suivant cette technique suppose qu'il soit possible d'incorporer quantitativement à une vingtaine de milligrammes de bromure de potassium quelques dizaines de microgrammes d'un produit dissous dans un volume relativement important de solvant , puisque cette solution représente , en fait , l'éluat d'un spot de chromatogramme . Comme l'élution doit être quantitative , donc s'effectuer dans des conditions telles qu'elle soit aussi complète que possible , il est , en effet , indispensable d'employer un volume suffisant de solvant . Ce stade des manipulations est certainement le plus délicat , et si les techniques que nous avons passées en revue dans le paragraphe précédent ne sont pas quantitatives , c'est principalement en raison des pertes qui se produisent au cours du transfert de la substance toxique sur le bromure de potassium . En outre, il est très important que le solvant soit d'une grande pureté , afin qu'il n'introduise pas dans le bromure de potassium d'impuretés nouvelles qui viendraient modifier le spectre et compromettre son interprétation . Heureusement , les solvants de qualité dite "pour spectrographie" satisfont à cette condition .

Le même souci d'éviter tout apport d'impureté justifie le choix d'une méthode chromatographique qui permette d'isoler les produits toxiques sous la forme de spots , dont l'éluat ne contiendra aucun résidu provenant de la phase stationnaire ou de la phase mobile . Ces

dernières doivent donc être constituées les unes par des substances fixes , totalement insolubles dans le liquide d'élution , les autres par des substances suffisamment volatiles pour qu'elles puissent être éliminées à une température relativement peu élevée , compatible avec la thermolabilité des produits à examiner . Pour ces diverses raisons , nous avons préféré utiliser la chromatographie en couche mince sur silice plutôt que la chromatographie sur papier . Il est en effet possible de se procurer de la silice très pure , alors que tous les papiers renferment des adjuvants , plus ou moins solubles dans les solvants qui sont susceptibles de servir d'agent d'élution .

La chromatographie en couche mince sur silice , lorsqu'elle est utilisée en vue d'un examen ultérieur par spectrométrie infrarouge , doit être entourée d'un certain nombre de précautions particulières :

- la phase stationnaire doit être préalablement lavée avec un mélange de chloroforme et d'acétone , ce lavage est destiné à éliminer les impuretés solubles dans le solvant d'élution .

- la phase mobile choisie ne doit être constituée que de produits volatils éliminables aisèment à une température peu élevée et ne contenir que le minimum d'impuretés fixes .

En outre , si les produits recherchés ne sont pas fluorescents , il est indispensable pour pouvoir procéder à leur repérage de déposer sur la "ligne de base" deux taches identiques , distantes de deux centimètres environ en évaporant le même volume de solution dans les

mêmes conditions ; l'existence de deux chromatogrammes parallèles sur la même plaque permet de localiser les spots en les révèlant sur l'un d'eux à l'aide d'un réactif approprié ; l'autre étant réservé à l'élution des produits en vue de leur examen spectrométrique dans l'infrarouge .

L'emplacement des spots non révélés est repéré par symètrie . La couche de silice est grattée sur la surface ainsi délimitée , et la poudre recueillie est transférée dans une petite allonge où elle est épuisée par un solvant approprié qui doit être anhydre et de qualité "pour spectroscopie" .

L'éluat obtenu est évaporé et le résidu séché sous courant d'air sec , afin de le débarasser de toute trace d'humidité qu'il serait difficile d'éliminer par la suite . Ce résidu est repris par le même solvant et la solution est évaporée , goutte à goutte , dans une microcupule en bromure de potassium , chauffée et balayée par un courant d'air sec .

La cupule sèche et refroidie est pesée , puis broyée très finement dans un petit mortier d'agate . Une fraction aliquote de la poudre obtenue , voisine de 20 mg , est utilisée pour la confection d'une micropastille selon la technique proposée par BOEHLER (38) .

En résumé , la méthode proposée comporte les étapes suivantes :

- l'isolement des toxiques par chromatographie sur

couche mince de silice ,

- le repérage des spots sur les chromatogrammes et leur élution ,

- l'évaporation des éluats dans des microcupules de bromure de potassium ,

- la préparation des micropastilles à partir des microcupules ,

- l'examen spectrométrique des micropastilles dans l'infrarouge (identification et dosage) .

Avant d'exposer le mode opératoire , nous décrirons le matériel utilisé .

2 - MATERIEL UTILISE

Les examens spectrométriques ont été effectués avec une appareil de série .

Par ailleurs , la mise au point de la méthode que nous proposons a nécessité la réalisation d'un certain nombre d'accessoires particuliers dont nous donnerons une description détaillée afin de permettre à d'éventuels utilisateurs de les faire fabriquer .

A - SPECTROMETRE INFRAROUGE

Nous utilisons un spectromètre LEITZ , modèle 111 . C'est un appareil à double faisceau dont le monochromateur comprend un prisme en chlorure de sodium de 60° associé à un miroir de LITTROW . Cet ensemble permet d'explorer la région du spectre comprise entre 1 et 15 µ . La source est constituée par un filament de NERNST et le détecteur par un thermocouple dans le vide .

Grâce à un dispositif réducteur de faisceau à transmission , il est possible de concentrer l'énergie sur une surface suffisamment réduite pour pouvoir examiner des échantillons ne dépassant pas 2 à 3 mm de diamètre . Ce dispositif entraîne une perte d'énergie qui est de l'ordre de 5 p. 100 . Pour cette raison , il nous a paru supérieur au dispositif réducteur de faisceau par réflexion pour lequel la perte d'énergie dépasse 50 p. 100 . La grande luminosité du montage par transmission assure une meilleure définition et , partant , facilite l'identification des composés lorsqu'ils sont examinés en très faibles quantités .

Le spectromètre peut être relié à un intégrateur par l'intermédiaire d'un potentiomètre logarithmique transformant les valeurs de la transmitance en absorbance , dont les valeurs intégrées , exprimées en millivolts , sont transcrites par un enregistreur potentiométrique .

B - DISPOSITIF D'ELUTION DES SPOTS

L'élution du toxique retenu sur la silice est réalisée dans de petites allonges (Fig. 1 , page 66)*. Celles-ci sont constituées d'un tube de verre effilé avec un étranglement qui retient une mèche de coton jouant le rôle de filtre . La partie supérieure du tube est évasée en collerette pour faciliter l'introduction de la poudre . La mèche de coton est tassée sur une longueur de 10 mm environ . L'emploi du coton nous a paru préférable à celui de la laine de verre recommandée par Mac COY et FIEBIG (19) , car il arrête mieux les grains de silice . Deux fils de coton placés dans la lumière du tube servent à régulariser l'écoulement du liquide d'élution et permettent d'éviter l'engorgement de l'allonge . Du fait de sa fragilité , il est préférable de protéger cette dernière en la maintenant à l'aide d'un bouchon de caoutchouc à l'intérieur d'un tube de verre un peu plus large .

L'introduction de la poudre dans l'allonge est facilitée par l'emploi d'un support en matière plastique et d'un petit entonnoir en acier inoxydable poli (Fig. 2 , page 67) , dont les schémas sont indiqués sur les figures n° 4 et n° 5 (pages 68 et 69).

* Pour des commodités de lecture , tous les tableaux et toutes les figures ont été mis en annexe à la fin de ce volume .

Un support à six alvéoles (Fig. n° 3 , page 67) permet de réaliser simultanément six élutions ; son schéma est représenté sur la figure n° 7 (page 70) .

C - MOULE DE FABRICATION DES MICROCUPULES EN BROMURE DE POTASSIUM

La microcupule de bromure de potassium se présente comme une calotte sphérique préparée à l'aide d'un moule . Ce dernier est formé d'un piston et d'une matrice . Ces deux pièces ont été réalisées dans un barreau d'acier inoxydable de 20 mm de diamètre . Le piston porte une tête cylindro-hémisphérique de 6,8 mm de diamètre , venant s'encastrer dans l'évidement hémisphérique de 7,0 mm de diamètre de la matrice . Ce moule est représenté sur la figure n° 8 (page 71) et son schéma sur la figure n° 10 (page 72) . Ces pièces ont subi un polissage très poussé , afin que le bromure de potassium n'adhère pas aux aspérités , ce qui empêcherait le démoulage des cupules .

D - DISPOSITIF D'EVAPORATION DES ELUATS

La solution à évaporer est déposée goutte à goutte dans une cupule en bromure de potassium . Pendant cette opération , la cupule est placée sur un support en acier inoxydable poli (Fig. n° 6 , page 69) qui repose sur une platine chauffante (Fig. n° 9 , page 71) . Afin de

maintenir la cupule et d'assurer un contact thermique suffisant , le support présente un évidement en forme de calotte sphérique . Il porte , en outre , un canal dans lequel on peut introduire un thermomètre qui sert à contrôler la température . Un courant d'air sec , éventuellement réchauffé , est dirigé sur la cupule à l'aide de deux tubes de verre inclinés d'environ 45° par rapport à la surface du support .

E - DISPOSITIF DE PREPARATION DES MICROPASTILLES

Nous utilisons un dispositif inspiré de celui qui a été mis au point par BOELHER (38) . Nous avons apporté à l'appareil initial plusieurs simplifications . Notre dispositif comprend seulement un piston et un élément de centrage en acier inoxydable poli qui vient s'adapter sur l'anneau de sertissage des pastilles (Fig. n° 11 , page 73). La tige du piston porte deux repères qui servent à contrôler le tassement de la poudre de bromure de potassium lors du remplissage .

3 - MODE OPERATOIRE

Nous supposerons que nous sommes parvenus au stade de l'analyse , ou nous disposons d'un résidu sec résultant de l'épuisement de matières biologiques quelconques par des solvants appropriés , suivant l'une des techniques habituellement utilisées en Toxicologie . Avant d'être soumis à l'analyse par spectrométrie infrarouge , les toxiques

éventuellement présents dans ce résidu doivent être séparés et purifiés par chromatographie en couche mince sur silice .

A - PREPARATION DES PLAQUES DE CHROMATOGRAPHIE

Les plaques sont préparées à l'aide d'un étaleur CAMAG selon la méthode de MUTTER et HOFSTETTER , citée par RANDERATH (7) , avec du Kiesel Gel G (Merck) . Mais avant de les utiliser , il est indispensable de laver la surface utile avec un mélange de chloroforme et d'acétone (1 : 1 , V/V) afin d'éliminer aussi complétement que possible les impuretés contenues dans le mélange de silice et de plâtre , qui pourraient ultérieurement se dissoudre dans le liquide d'élution et souiller le produit pur qui a été isolé . Ce lavage est réalisé en effectuant une chromatographie ascendante avec le mélange de solvants indiqué . Les solvants sont ensuite éliminés par évaporation et la silice est activée par chauffage à + 130° C pendant une heure .

La solution de produit à chromatographier obtenue en dissolvant le résidu sec dans le mélange d'acétone et de chloroforme est répartie sur la ligne de base en deux taches identiques par évaporation d'un même volume de solution dans les mêmes conditions .

B - REVELATION ET REPERAGE DES SPOTS

Après le développement du chromatogramme et l'élimination des solvants par séchage à une température qui n'éxcède pas + 60° C de manière à éviter l'altération des produits relativement fragiles , les plaques sont mises à refroidir dans un dessicateur .

Les spots sont ensuite localisés par examen en lumière de WOOD ou par pulvérisation d'un réactif approprié . La lumière ultraviolette permet de repérer l'emplacement des spots fluorescents de certains alcaloïdes (papavérine , quinine , etc...) ou d'autres produits tels que la nialamide . Elle sert aussi à repérer des plages dont la teinte tranche légèrement sur celle du fond du chromatogramme . Ce repérage peut permettre ultérieurement une localisation plus précise des spots dont les symétriques sont révélés par pulvérisation de réactifs , GOENECHEA (22) a proposé un procédé sensiblement analogue pour repérer les spots sur les chromatogrammes en couche mince .

Comme cette pulvérisation entraîne une modification du produit présent dans le spot ainsi que la formation d'un dépot de substances étrangères , qui rendent impossible l'analyse par spectrométrie infrarouge , il ne faut donc révéler qu'un seul des deux chromatogrammes en veillant à préserver l'autre de toute souillure par le réactif , but que l'on atteint en recouvrant le chromatogramme à protéger avec une plaque de verre .

Le réactif est choisi en fonction du groupe de produits à révéler :

- pour les alcaloïdes , nous avons employé le réactif iodoplatinique , préparé en mélangeant 5 ml d'une solution à 5 p. 100 de chlorure de platine dans l'acide chlorhydrique N avec 45 ml d'une solution aqueuse d'iodure de potassium à 5 p. 100 et en complétant le volume à 100 ml avec de l'eau distillée ; en présence de ce réactif , les spots d'alcaloïdes apparaissent sous forme de taches dont la coloration varie du rose au violet ; ce réactif révèle également les spots de chlordiazepoxide (Librium) de diazepam (Vallium) et de glutéthimide (Doridène).

- les barbituriques et le méprobamate sont révélés par pulvérisations successives de deux réactifs : une solution aqueuse de nitrate mercurique à 5 p. 100 puis une solution chloroformique de diphénylcarbazone à 0,1 p. 100 ; les spots apparaissent colorés en bleu violacé .

- l'imipramine (Tofranil) qui ne donne pas de réactions colorées avec les réactifs précédents est mise en évidence par pulvérisation d'une solution de chlorure ferrique dans l'acide nitrique à 50 p. 100 ; sous l'action de ce réactif , elle prend une teinte verte .

Pour délimiter l'emplacement des spots symétriques de ceux qui ont été révélés , nous procédons de la manière suivante : à l'aide d'une fine pointe d'acier , nous traçons la perpendiculaire à la ligne de base passant par la tache correspondant au dépôt , puis nous traçons deux parallèles au front du solvant encadrant les parties infé-

rieures et supérieures du spot révélé ; compte tenu de la largeur de ce spot , il est alors possible de délimiter par un trait une surface incluant la tache du toxique .

On isole la surface correspondant au spot en râclant la silice à l'extérieur du trait avec une petite spatule d'acier sur une largeur de 5 mm , puis on détache la silice retenant le toxique et on recueille la poudre obtenue dans l'allonge qui va servir à l'élution .

C - ELUTION DES SPOTS

L'élution du toxique retenu par la silice est réalisée avec 6 ml d'acétone pur "pour spectroscopie" utilisés par fractions de 0,5 ml . L'éluat recueilli dans un tube est évaporé sous un courant d'air sec jusqu'à dessication complète . Il est important d'éliminer toute trace d'eau à ce stade de la manipulation , car , en présence de bromure de potassium , cette élimination nécessiterait une élévation de la température à + 130° C qui serait incompatible avec la thermolabilité de la plupart des toxiques organiques .

D - EVAPORATION DES ELUATS DANS LES MICROCUPULES DE BROMURE DE POTASSIUM

L'évaporation des éluats est effectuée dans des microcupules de bromure de potassium préparées de la façon suivante : un

poids de 40 mg de bromure de potassium "pour spectroscopie" est réparti dans l'évidement de la matrice et recouvert avec le piston . On comprime le moule à 1,5 T. / cm2 pendant 10 secondes . La cupule de bromure de potassium est prête à être démoulée .

Une fois desséché , le résidu de l'éluat est repris par 0,1 ml d'acétone pur "pour spectroscopie" . La solution obtenue est aspirée dans une microburette , fabriquée avec une pipette de 0,2 ml , finement étirée pour donner des gouttes de 5 µl environ et sur laquelle est fixée une poire de caoutchouc commandée par une vis micrométrique.

La solution contenue dans la microburette est déposée "goutte à goutte" , dans la cupule de bromure de potassium placée sur son support chauffant , entre les deux arrivées d'air sec . Le rythme d'écoulement des gouttes doit être réglé de telle façon que chaque goutte ne tombe dans la cupule qu'après évaporation de la goutte précédente .

Le tube ayant contenu le résidu d'éluat est lavé à deux reprises avec 0,1 ml d'acétone pur "pour spectroscopie" et la solution est évaporée dans la cupule suivant le même mode opératoire .

E - PREPARATION DES MICRO-PASTILLES

La cupule de bromure de potassium contenant le toxique est pesée , puis écrasée avec précaution pour éviter les projections et

broyée finement dans un mortier d'agate . Vingt milligrammes environ de la poudre obtenue , pesés avec précision, serviront à la préparation de la micropastille .

Nous utilisons la méthode de BOEHLER (38) en employant le moule à pastille sous vide LEITZ et la presse WEBER . Un poids de 800 mg de bromure de potassium 'pour spectroscopie" , desséché et broyé au mortier d'agate , est déposé dans la cuvette.formée par un anneau de laiton de 20 mm de diamètre placé sur son support . On fixe sur l'anneau l'élément de centrage décrit précédemment (Fig. n° 11 , page 73) puis , à l'aide du piston , on écarte le bromure de potassium de façon à créer une cheminée de 3 mm de diamètre . On retire le piston et la cheminée est remplie avec les 20 mg de poudre prélévés . Cette poudre doit être ajoutée par petites portions et tassée chaque fois à l'aide du piston , en contrôlant le tassement grâce aux deux repères gravés sur sa tige . L'élément de centrage est retiré et la préparation de la pastille est achevée selon la méthode habituelle.

F - MESURES SPECTROMETRIQUES

a - Conditions opératoires

La micropastille est placée sur son support , à l'intérieur du dispositif réducteur de faisceau par transmission . En principe , il convient de vérifier le centrage de l'échantillon ; mais , à l'issue d'une longue série d'essais , nous avons pu constater que les

réglages mécaniques de l'appareil restent stables pendant plusieurs mois et qu'en fait cette vérification n'est pas indispensable .

Sur le faisceau de référence , une grille mobile réalise une atténuation indépendante de la longueur d'onde , qui permet de décaler la ligne de base . Ce réglage est réalisé dans une région du spectre dépourvue de bandes d'absorption , qui se situe , pour les produits que nous avons étudiés , au voisinage de 5 µ . Toutefois , il ne faut pas que l'atténuation atteigne une valeur trop élevée , ce qui traduirait l'existence d'un fond spectral important , responsable d'une perte d'énergie qui serait préjudiciable à l'identification et au dosage du toxique . Dans la majorité des cas , nous n'avons pas utilisé une atténuation supérieure à 25 p. 100 .

Pour tous nos essais , nous avons adopté le programme 2 qui correspond à une ouverture de fente de 0,047 mm à 2 µ. , 0,22 mm à 6 µ. , 0,41 mm à 10 µ. et 1,0 mm à 15 µ. Un programme de fentes plus fin (3 ou 4) n'apporte aucune amélioration du pouvoir de résolution pour les corps que nous avons étudiés à l'état solide . Par contre , la diminution de luminosité qui en résulte conduit à utiliser des vitesses d'enregistrement lentes prolongeant inutilement la durée de l'examen .

Nous avons toujours opéré avec la même vitesse d'enregistrement (1 minute par micron) , vitesse moyenne , qui nous a paru la mieux adaptée à l'ensemble des cas examinés .

D'une manière générale , nous avons enregistré les spectres de 2 à 15 µ. Mais nous avons constaté que la région située entre 2 et 5 µ. ne contient pratiquemment pas d'information utile à l'identification des produits recherchés . En effet , l'élimination de l'eau n'étant jamais parfaite , tous les spectres présentent une bande d'absorption intense à 2,95 µ. (3390 cm^{-1}) due à la vibration -OH associée. De plus , la présence d'impuretés , même à l'état de traces , provoque l'apparition de bandes parasites entre 3 et 4 µ. qui gênent considérablement l'interprétation du spectre et rendent impossible tout dosage dans cette région . C'est notamment le cas des graisses dissoutes par l'acétone au cours de l'élution des spots qui donnent un système de bandes intenses dues aux vibrations $-CH_3$ et $-CH_2$ à 3,40 µ (2941 cm^{-1}) , 3,44 µ (2907 cm^{-1}) , 3,51 µ (2849 cm^{-1}) (1) , (11) . Enfin , la région de 4 à 5 µ ne comporte le plus souvent aucune bande d'absorption . Donc seule la région du spectre comprise entre 5 et 15 µ nous a servi à effectuer des déterminations qualitatives et quantitatives .

b - Identifications des toxiques

Les composés que nous avons étudiés étaient des barbituriques , des alcaloïdes , des psycholeptiques ou des psychoanaleptiques , couramment utilisés en thérapeutique et dont les spectres de référence figurent dans le fichier SADTLER (9) ou l'ouvrage de Toxicologie de STEWART (10) . Le cas échéant , des composés d'utilisation moins courante peuvent être identifiés en s'adressant à d'autres fichiers plus spécialisés (DMS , COBLENTZ , IR Data Comittee of Japon) . Il

serait également possible de recourir au fichier mécanographique infrarouge IBM . Mais cette façon d'opérer nous paraît superflue du fait que les toxiques ont déjà pu être classés dans un groupe (alcaloïde , barbiturique , tranquilisant...) grâce à la réaction qui a servi à les localiser sur les chromatogrammes . Chacun de ces groupes ne comprend qu'un nombre relativement limité de représentants habituellement utilisés en thérapeutique .

La plupart des produits que nous avons examinés peuvent être identifiés directement en comparant leur spectre au spectre de référence indiqué sur les fichiers . Toutefois , nous avons remarqué que la chromatographie sur couche mince de silice provoque dans la structure de plusieurs composés des transformations qui se traduisent par des modifications des spectres d'absorption , parfois minimes et sans incidence notable sur l'interprétation des spectres (ex. : cocaïne , barbital) , mais parfois importantes (ex. : atropine , nialamide) et nécessitant alors de se référer à un spectre établi avec un produit traité dans des conditions analogues de chromatographie et d'élution .

En outre , nous avons pu observer l'existence constante d'une bande parasite intense , mais très fine , à 7,22 µ (1385cm^{-1}) sur tous les spectres de produits élués d'un spot de chromatogramme (Fig. n° 12 , page 74) . Cette bande pourraît être attribuée à des hydrocarbures saturés , mais dans ce cas , elle devrait être accompagnée d'une bande d'intensité plus forte à 6,83 µ (1464 cm^{-1}) (11) . Or si cette dernière bande est bien présente sur tous les spectres , elle a ,

par contre , une intensité quatre à cinq fois plus faible que l'autre . Il semblerait donc que la bandes située à 1385 cm^{-1} puisse être attribuée aux ions NH_4^+ ou NO_3^- , car on retrouve une bande analogue intense et fine sur les spectres des sels d'ammonium et des nitrates (1) , (6) , (9) .

Les bandes moins intenses situées à 5,80 µ (1724 cm^{-1}) et à 7,75 µ (1290 cm^{-1})) n'ont pu être attribuées . Enfin , des bandes de faible intensité apparaissent à 8,90 µ (1124 cm^{-1}) (ion sulfate) et à 9,30 µ (1075 cm^{-1}) (silice) (1), (6) , (9) . Toutes ces bandes parasites apparaissent d'une manière très nette sur le spectre de la figure n° 12 (page 74) , obtenu à partir de l'éluat provenant du traitement par 20 ml d'acétone "pour spectroscopie" de 100 mg de sllice G pour chromatographie en couche mince. Ces quantités sont évidemment très supérieures à celles qui sont utilisées pour l'isolement des toxiques , 6 ml d'acétone servant à traiter 30 à 40 mg de silice G , mais elles étaient nécessaires à l'obtention de bandes suffisamment intenses pour permettre de déterminer leur origine . En résumé , en dehors de la bande à 7,22 µ (1385 cm^{-1}), les bandes parasites dues à la présence d'impuretés présentes dans les éluats n'apportent que des modifications minimes au fond spectral et n'influent pratiquement pas sur l'interprétation des spectres (Fig. n° 12 , page 74) .

c - Dosage des toxiques

Seules les bandes d'absorption qui permettent d'effectuer les dosages des produits que nous avons étudiés sont indiquées

dans les tableaux n° 1 et 2 (page 88 à 93) . En effet , toutes les bandes d'absorption d'un spectre ne se prêtent pas nécessairement à une détermination quantitative , car toutes ne fournissent pas une correspondance linéaire entre la hauteur ou la surface des pics et les quantités de produits présents dans l'échantillon examiné .

Après avoir choisi la bande convenant au dosage , il faut procéder à l'intégration du pic délimité par la courbe d'absorption et la tangente aux deux minimum d'absorption qui encadrent ce pic ; suivant les indications de WRIGHT (39)(Fig. n° 13 , page 75) . Toutes les méthodes classiques d'intégration peuvent être utilisées : la plus commode emploie un intégrateur électronique qui fournit directement l'absorbance intégrée exprimée en Volts . La valeur trouvée , multipliée par un facteur de conversion déterminé expérimentalement , donne une autre valeur exprimée en unité d'absorbance intégrée (U.A.I.) . Cette valeur reportée sur une courbe de référence indique le poids de toxique contenu dans la micropastille . A partir du résultat , on calcule la quantité de toxique présente dans le spot du chormatogramme .

d - Préparation des courbes de référence

Les courbes de référence sont établies à partir de solutions de produits purs dans l'acétone "pour spectroscopie" à la concentration de 400 µg par ml.

Des volumes de 50 µl , 100 µl , 150 µl et 200 µl sont

évaporés dans des microcupules en bromure de potassium qui servent ensuite à préparer des micropastilles selon le mode opératoire décrit précédemment .

En fonction du poids de produit présent dans la micropastille , on trace la courbe :

$$A_{UAI} = f\ (m_{\mu g})$$

Dans les tableaux n° 1 et 2 (page 88 à 93) nous indiquons les pentes des courbes de référence obtenues pour les divers toxiques que nous avons étudiés .

Les micropastilles conservées à l'abri de la lumière et de l'humidité peuvent être utilisées pour toutes vérifications ultérieures de la courbe de référence . Ainsi au cours de notre travail , nous avons préparé environ 400 micropastilles qui sont encore utilisables à l'heure actuelle bien que certaines d'entre elles datent de cinq années .

- IV -

DISCUSSION

DE LA

METHODE PROPOSEE

Guidés par le souci d'obtenir des résultats quantitatifs , nous nous sommes attachés à réduire , dans la mesure du possible , les pertes de toxique et les autres causes d'erreur qui peuvent se produire à chaque stade de la manipulation . Et c'est seulement après un grand nombre d'essais que nous sommes parvenus à mettre au point une méthode qui présente une sensibilité et une précision compatible avec l'analyse toxicologique .

1 - ELUTION DES SPOTS DE CHROMATOGRAMME

La première condition à réaliser est d'effectuer une élution aussi complète que possible du toxique fixé sur la poudre de silice et constituant le spot du chromatogramme. Cette nécessité implique que le liquide utilisé pour l'élution possède un pouvoir dissolvant suffisant vis-à-vis de l'ensemble des toxiques organiques non volatils. En outre, compte tenu des manipulations ultérieures notamment des conditions d'évaporation, le solvant utilisé doit être suffisamment volatil pour qu'il soit possible de l'évaporer rapidement sous un courant d'air, à une température inférieure à celle qui est susceptible d'entraîner les altérations des composés organiques. Enfin, pour éviter la destruction de la cupule de bromure de potassium, le solvant ne doit exercer sur ce sel qu'une action dissolvante minime.

Cinq solvants satisfont plus ou moins aux conditions que nous venons d'énumérer. Ce sont le chloroforme, l'éther, l'acétone, l'éthanol et le méthanol. Nous avons retenu l'acétone. L'éther trop volatil peut être la cause de variations de volume au cours des manipulations qui portent sur de faibles quantités de solution. Le chloroforme a un pouvoir dissolvant vis-à-vis des toxiques organiques qui n'est pas suffisament étendu. L'éthanol et le méthanol ont des points d'ébullition trop élevés et , de plus , ils dissolvent le bromure de potassium d'une manière non négligeable .

Nous avons expérimenté longuement plusieurs procédés d'élution :

- agitation de la silice dans un volume déterminé d'acétone (3 fois 2 ml) ; suivie d'une séparation par centrifugation.

- extraction par passage de l'acétone sur la silice contenue dans une petite allonge fermée par une plaque de verre fritté.

Dans les deux cas , l'élution s'est avérée insuffisante et la quantité de toxique retrouvée dans l'éluat était très inférieure à la quantité théorique , 20 à 30 p. 100 dans les cas les plus favorables . Ces valeurs sont semblables à celles que donne HEYDEN (5) . Avec le second procédé , le passage trop rapide de l'acétone sur la silice nous a paru responsable de la mauvaise élution . Cette observation nous a conduit à réaliser un dispositif reposant sur le même principe , mais dans lequel le solvant s'écoule avec un débit beaucoup plus lent grâce à la présence d'une mèche de coton (Fig. n° 1 , Page 66).

2 - TRANSFERT QUANTITATIF DES TOXIQUES SUR LE BROMURE DE POTASSIUM

Cette phase de la manipulation est la plus délicate et elle semble avoir été à l'origine de bien des déboires pour de nombreux auteurs.

Le procédé que nous avons expérimenté en premier lieu consistait à laisser tomber goutte à goutte la solution acétonique de toxique sur un petit tas de bromure de potassium dans un verre de montre placé sur une platine chauffante. Les pertes se sont révélées considérables, une petite fraction seulement du toxique, de l'ordre de 20 p. 100, venait se déposer sur le bromure de potassium. Cherchant à remédier à cet inconvénient, nous avons procédé à la même opération, en plaçant directement la poudre de bromure de potassium dans le petit mortier d'agate qui sert au broyage lors de la préparation de la micropastille. Nous pouvions ainsi avoir l'espoir de récupérer la fraction du toxique qui se dépose non sur le bromure de potassium, mais sur la paroi du récipient. Contrairement à notre attente, cette modification n'a pas amélioré le rendement du procédé.

Nous avons alors tenté d'opérer par évaporation d'une solution mixte de bromure de potassium et de toxique. Là encore, le toxique avait tendance à se déposer sur la paroi du récipient plutôt que sur les cristaux de bromure de potassium .

L'évaporation du solvant dans un récipient revêtu intérieurement d'un dépot de bromure de potassium , obtenu par évaporation préalable d'une solution aqueuse de ce sel n'a pas donné de meilleurs résultats . Il semble que le dépôt , de structure cristalline , ne retienne pas la solution . En outre , pour récupérer le bromure de potassium , il était nécessaire de gratter la surface du récipient , opération qui détachait de fines particules de silice dont la présence perturbait les spectres d'absorption .

Ces techniques avaient déjà été employées par plusieurs auteurs [12] , [16 , [18] , [25] , [33] , [34] , [37] , qui avaient remarqué qu'aucun de ces procédés ne permet d'effectuer des mesures quantitatives . En fonction de nos observations , nous avons alors pensé que la solution de toxique doit être évaporée sur un dépôt de bromure de potassium présentant une surface continue . Pour réaliser cette condition , il n'est pas de meilleure solution que d effectuer l'évaporation dans un récipient en bromure de potassium imperméable à l'acétone . Mais les dimensions de ce récipient doivent être aussi réduites que possible , car il ne faut pas oublier qu'on ne peut introduire dans la micropastille que 20 mg environ de ce sel . L'emploi d'une quantité trop importante conduirait à une réduction de la sensibilité du procédé .

Les cupules que nous préparons pèsent environ 40 mg pour un diamètre extérieur de 7 mm . Elles ne sont donc pas parfaites , puisque seulement la moitié du toxique qu'elles renferment sert à la mesure spectrométrique . Malheureusement , nous n'avons pas pu utiliser

des cupules de plus petite taille qui sont difficiles à fabriquer et d'une capacité insuffisante pour recevoir sans perte les gouttes d'éluats acétoniques.

3 - IDENTIFICATION DES TOXIQUES A PARTIR DES SPECTRES

Lorsque la chromatographie ne provoque pas de modifications de structure, l'identification des produits se fait aisément par comparaison de leur spectre avec ceux d'un fichier de référence .

Par contre , l'utilisation de ces fichiers devient impossible lorsque les spectres des produits séparés par chromatographie en couche mince ne sont plus identiques à ceux des produits purs . De tels cas sont assez fréquents . Dans le tableau n° 3 (page 94) , nous donnons toute la classification des toxiques étudiés en fonction de l'importance des modifications apportées à leurs spectres par la chromatographie et sur les figures n° 15 à 24 (pages 76 à 85), nous reproduisons les spectres qui sont les plus modifiés .

L'origine des modifications est difficile à déceler et ce phénomène mériterait de faire l'objet d'une étude particulière . Toutefois , nous pouvons préciser que la chromatographie en couche mince sur silice paraît affecter plus particulièrement certaines bandes correspondant aux vibrations - CO dans la région de 6 µ. A titre d'exemple,

on observe sur le spectre du chlordiazepoxide (librium) deux bandes à 5,95 µ (1680 cm-1) et à 6,18 µ (1618 cm-1) ; après élution du spot sur couche mince de silice , seule la dernière bande subsiste . Il en est de même pour le spectre infrarouge de la cocaïne qui présente des bandes à 5,72 µ (1748 cm-1) et 5,82 µ (1718 cm-1) ; seule la bande à 5,82 µ est encore apparente après élution du spot par l'acétone .

L'existence éventuelle de modifications apportées par la chromatographie en couche mince sur silice à la structure des toxiques complique dans certains cas leur identification . Pour pallier cet inconvénient , il faudrait pouvoir disposer pour les toxiques organiques non volatils d'un fichier des spectres de référence établis sur des produits ayant subi une chromatographie en couche mince , dans des conditions opératoires bien déterminées . Nous avons dans le cadre de cette étude présenté un certain nombre de ces spectres .

4 - DOSAGE DES TOXIQUES

A - CHOIX DE LA BANDE CLE

Telle qu'elle est définie par LECOMTE (23) une bande clé doit présenter une forte absorption , être bien isolée des autres bandes et posséder une forme aisément reconnaissable , même pour de faibles quantités de produits .

Sur les spectres des toxiques que nous avons étudiés , nous avons relevé plusieurs bandes répondant à cette définition . Pour la plupart d'entre elles , nous avons établi une courbe de référence selon le mode opératoire décrit précédemment . A l'issue de ces essais , nous avons constaté que toutes les bandes clés ne sont pas utilisables pour les dosages , car , avec certaines , la relation entre la quantité de toxique présente dans la micropastille et la valeur de l'absorbance intégrée n'est pas linéaire . Nous donnons un exemple de ce phénomène sur la figure n° 25 (page 86) qui représente des courbes de référence établies avec un échantillon de **Codéi**ne sur trois bandes d'absorption. Une seule de ces courbes est linéaire . Cette constation nous a conduit à sélectionner , pour chaque toxique , la ou les bandes qui se prêtent à un dosage spectrométrique . Ce sont ces bandes qui figurent dans les tableaux n° 1 et 2 (pages 88 à 93) . Bien que l'absence de linéa - rité ne constitue pas en elle-même un obstacle majeur à une détermination quantitative , nous avons préféré n'utiliser pour les dosages que les bandes correspondant à une relation linéaire . En effet , le manque de linéarité peut être la conséquence de divers phénomènes dont l'intensité n'est pas nécessairement reproductible d'une détermination à l'autre . Au nombre de ces phénomènes figurent la diffusion , dont l'effet se manifeste d'une manière plus ou moins intense selon des bandes , l'effet Christiansen , l' "effet de matrice" consécutif à des interactions physiochimiques entre le bromure de potassium et le toxique , les phénomènes d'association que présentent certains radicaux - OH , - NH , le phénomène de couplage entre deux vibrations et enfin l'effet thermique dû à l'échauffement de la micropastille placée dans le faisceau

infrarouge . En effet, lorsqu'une micropastille est restée exposée au rayonnement infrarouge concentré sur une petite surface par le dispositif réducteur de faisceau , pendant 15 minutes , temps nécessaire à l'enregistrement d'un spectre , on observe une augmentation de la température qui est de l'ordre de+15° C . Cette constatation prouve qu'il est justifié , dans certains cas , d'ampêcher l'échauffement de la micropastille en la soumettant à un refroidissement par air .

B - MODE D'EXPRESSION DES ABSORBANCES

Pour effectuer les dosages , la plupart des auteurs rapportent les quantités de produits présentes dans le faisceau à l'absorbance (A) mesurée au maximum d'absorption . Ils appliquent la loi de BEER :

$$A = \log \frac{I_o}{I} = k\,n$$

I_o = intensité du rayonnement incident

I = intensité du rayonnement transmis

n = nombre de centres absorbants dans le faisceau

k = facteur de proportionalité

Lorsque la totalité du produit constituant les centres absorbants se trouve dans le faisceau , on peut alors écrire :

$$A = K\,m$$

m = poids de produit

K = nouveau facteur de proportionalité

Si la substance suit la loi de BEER , ce mode d'expression est rigoureusement exact du point de vue théorique , mais son application pratique se heurte néanmoins à de nombreuses difficultés liées aux conditions opératoires qui comportent de nombreuses sources d'erreur.

Il importe avant tout de corriger la valeur de l'absorbance mesurée au maximum d'absorption en fonction du fond spectral . Plusieurs méthodes ont été proposées pour réaliser cette correction . Celle qui semble la plus satisfaisante est indiquée par WRIGHT (34) . Cette méthode , dite méthode de " la ligne de base ", consiste à tracer la tangente à la courbe d'extinction , au niveau de deux minimum qui encadrent la bande d'absorption . Cette droite coupe en un point B (fig 14a), (page 75) la perpendiculaire à l'axe des longueurs d'onde passant par le point A. maximum d'absorption . La valeur du segment $\overline{AB}$ permet de calculer l'absorbance corrigée . Plus récemment , PIRLOT (28) (29) a proposé une méthode différente : il choisit de part et d'autre de la longueur d'onde λ_o correspondant au maximum d'absorption deux points équidistants $\lambda_o - \Delta\lambda$ et $\lambda_o + \Delta\lambda$, puis il abaisse les perpendiculaires à l'axe des longueurs d'onde en ces points qui coupent le tracé du spectre d'absorption en deux points M_1 et M_2 (fig 14b, page 75) . La droite $\overline{M_1 M_2}$ est considérés comme ligne de base et PIRLOT détermine sur cette ligne le point B ; le segment $\overline{AB}$ mesure l'absorbance corrigée . Mais , dans un cas comme dans l'autre , l'absorbance corrigée n'est qu'une absorbance apparente , distincte de l'absorbance vraie , qui ne peut être déterminée qu'au prix de calculs complexes (13) (27).

Une mesure rigoureuse de l'absorbance nécessite que toute la bande soit enregistrée avec une largeur de fente constante , car l'absorbance varie en fonction de la largeur de la fente . Par contre l'aire d'une bande d'absorption (absorbance totale ou absorbance intégrée) reste rigoureusement constante quelle que soit la largeur de fente utilisée pour enregistrer le spectre (23) . Il n'est donc plus nécessaire qu'une bande ait été enregistrée avec une largeur de fente constante pour qu'elle se prête au calcul de l'absorbance totale et il devient possible de procéder à l'enregistrement , selon la technique habituelle , en utilisant un programme de fente , donc dans les conditions de résolution les plus favorables . En pratique , on calcule l'absorbance intégrée évaluée entre deux limites de longueur d'onde . La valeur ainsi obtenue est très proche de l'absorbance totale vraie .

En nous inspirant de la méthode de WRIGHT (39) , nous calculons l'absorbance intégrée correspondant à la surface comprise entre la courbe d'absorption et la ligne de base (fig 13 , page 75) . Grâce à cette correction , nous avons pu minimiser l'influence du fond spectral , toujours assez intense , quand les mesures spectrométriques portent sur des substances extraites de milieux biologiques , même si ces dernières ont préalablement subi une purification poussée .

Si en principe , toutes les méthodes d'intégration peuvent être employées , la meilleurs est cependant celle qui utilise un intégrateur électronique fournissant une tension de sortie proportionnelle à l'aire intégrée . Cette tension exprimée en mV. pourrait

être utilisée directement , mais il nous a paru plus conforme à la terminologie utilisée en spectrométrie d'exprimer ces valeurs en unités d'absorbance intégrée (U. A. I.). Nous définissons arbitrairement cette unité comme étant la valeur qui représente une surface d'absorbance égale à 1 pour un intervalle de longueur d'onde de 1 µ. La correspondance entre l'unité d'absorbance intégrée et le mV. a été établie expérimentalement et trouvée égale à $3,28.10^{-2}$ U.A.I. par mV. Nous avons rapporté cette unité d'absorbance intégrée à un intervalle exprimé en longueur d'onde , contrairement à la terminologie usuelle qui utilise les nombres d'onde , car notre spectromètre possède une échelle linéaire en longueurs d'onde . Mais il serait facile de transformer l'unité d'absorbance intégrée pour la rapporter à un intervalle exprimé en nombre d'onde en faisant intervenir un facteur approprié .

C - SENSIBILITE DE LA METHODE

La sensibilité de la détection d'un toxique par la méthode spectrométrique infrarouge dépend de deux facteurs : la nature du produit examiné , qui détermine l'intensité des bandes d'absorption et les performances de l'appareillage utilisé .

Un spectre infrarouge n'est représentatif d'un composé que si les bandes ultimes se détachent du fond spectral d'une manière significative (23) . Nous estimons , après avoir examiné les spectres enregistrés au cours de ce travail , que cette condition se trouve réalisée lorsque la diminution de transmitance par rapport au fond spectral atteint au moins 5 p. 100 .

En se basant sur ce critère , nous avons constaté que le seuil de détection se situe au voisinage de 5 µg. pour la plupart des toxiques , sauf dans quelques cas particulièrement défavorables , où ce seuil ne descend pas au dessous de 10 µg. Il faut bien préciser que ces seuils de 5 ou 10 µg que nous indiquons se rapportent aux quantités de produits présents dans les micropastilles . Or , ainsi que nous l'avons déjà signalé , la quantité de bromure de potassium qui compose la cupule est trop importante pour qu'il soit possible de l'incorporer en totalité dans la micropastille . En fait , celle-ci est préparée en utilisant seulement la moitié de la poudre obtenue par pulvérisation de la cupule. Le seuil de détection dans les spots des chromatogrammes doit donc être multiplié par deux et porté à 10 ou 20 µg de toxique . Toutefois , il serait certainement possible d'améliorer la sensibilité de cette méthode en utilisant un spectromètre de meilleure performance .

D - PRECISION DE LA METHODE

La méthode que nous avons étudiée et mise au point pour identifier et doser les toxiques organiques non volatils isolés des milieux biologiques comporte plusieurs manipulations dont chacune peut engendrer des pertes plus ou moins importantes de produit recherché . Ce sont , prises dans l'ordre inverse de l'ordre chronologique où elles sont effectuées :

- la préparation des micropastilles ,
- l'évaporation des éluats dans les microcupules ,
- l'élution des spots de chromatogrammes ,
- la chromatographie en couche mince sur gel de silice et la localisation des spots .

Nous nous sommes donc proposé d'évaluer l'importance des erreurs apportées par chaque stade de la manipulation . Dans ce but , nous avons réalisé plusieurs séries d'expériences qui ont consisté à rechercher des quantités de toxiques que nous avions introduites aux différents stades de la manipulation . Nous sommes partis de l'opération finale , la préparation des micropastilles et nous sommes remontés vers l'opération initiale , l'obtention des chromatogrammes , en passant par les stades intermédiaires , évaporation des éluats sur le bromure de potassium et élution des spots des chromatogrammes .

a) erreur due à l'emploi des micropastilles

Avant d'envisager l'application d'une méthode reposant sur l'emploi des micropastilles , nous devions nécessairement vérifier que leur fabrication est reproductible .

Nous avons préparé dix micropastilles renfermant chacune 40 µg de papavérine base en triturant cet alcaloïde en poudre avec du bromure de potassium dans un petit mortier d'agate . Nous avons pu ainsi calculer la dispersion des absorbances intégrées correspondantes . Nous avons trouvé pour les dix déterminations une valeur moyenne de 171,7 U.A.I. avec un écart type égal à 5,49 soit une précision de ± 10,5 p. 100 pour une probabilité de 90 p. 100 .

Ayant ainsi établi qu'il est possible d'obtenir un enregistrement reproductible du point de vue quantitatif , en opérant sur des micropastilles , nous avons pu utiliser cette méthode comme référence

pour évaluer les pertes éventuelles de toxique qui se produisent au cours des opérations qui précédent le pastillage . A cet effet , nous avons déterminé les données nécessaires à l'établissement des courbes de référence pour huit alcaloïdes , par mélange et trituration de poudres . Ces données sont rassemblées dans le tableau n° 4 , page 95 . Pour chaque produit , nous précisons la zone d'intégration , les absorbances intégrées correspondant à des poids de 10 , 20 , 30 et 40 µg , ainsi que la pente de la courbe de référence exprimée en U.A.I. 10^{-2} par µg . Pour la plupart des toxiques , nous indiquons les données obtenues par l'intégration de plusieurs bandes différentes .

A l'occasion de la préparation de ces courbes de référence , nous avons remarqué que l'un des toxiques étudiés échappe à cette méthode d'analyse , car il est volatilisé sous l'effet de la basse pression qui doit nécessairement être réalisée dans la presse avant la compression des pastilles . Il s'agit du carbamate de méthyl-3-pentynol-3 (N-Oblivon) . De fait , nous n'avons retrouvé ce produit dans aucune des micropastilles auxquelles nous l'avions incorporé . Toutefois, cette particularité ne vaut que pour la technique de préparation des micropastilles qui met en oeuvre des doses de produit extrêmement faibles de l'ordre de quelques dizaines de microgrammes . Nous avons en effet pu préparer avec le carbamate de méthyl-3-pentynol-3 des pastilles de taille normale , dans lesquelles quelques milligrammes de produit sont incorporés à 800 mg de bromure de potassium et constaté ainsi que les pertes par volatilisation deviennent négligeables par rapport à la masse totale .

b) erreur provenant de l'évaporation des éluats sur le bromure de potassium

Si la microcupule est parfaitement étanche et si l'éluat ne déborde à aucun moment , l'évaporation sur le bromure de potassium s'effectue d'une manière quantitative et sans aucune perte .

Toutefois , pour vérifier qu'il en est bien ainsi , nous avons établi des courbes de référence pour sept alcaloïdes en opérant par évaporation de solutions acétoniques titrées dans des microcupules de bromure de potassium (tableaux n° 5 et n° 6 , pages 98 à 107) . Puis , nous avons comparé les pentes moyennes des courbes de référence obtenues avec celles des courbes qui avaient été préalablement établies en mélangeant des poudres par trituration au mortier d'agate . Les résultats de cette comparaison sont indiqués dans le tableau n° 7 , (page 108) . Ils font apparaître que , dans cinq cas (aconitine , pour la zone d'intégration comprise entre 7,41 et 8,14 µ , cocaïne , codéine, colchicine et papavérine , il existe une différence significative , par défaut ou par excès , entre les courbes de référence , ce qui traduit l'existence d'une cause d'erreur systématique .

Le fait qu'une différence significative existe pour l'aconitine sur une seule des deux zones d'intégration indique que la différence par défaut n'est pas la conséquence d'une perte de toxique , mais résulte d'une modification de la texture de la micropastille , ou , d'un changement dans l'état cristallin du toxique survenu au cours de

l'évaporation de la solution acétonique . On pourrait attribuer les mêmes origines aux différences par excès observées pour les pentes moyennes des courbes de référence obtenues avec la codéine et la colchicine.

L'existence de variations significatives entre les pentes des courbes de référence établies selon les deux techniques , même dans un nombre limité de cas , nous incite à préconiser l'emploi des courbes de référence obtenues par évaporation de solutions acétoniques de toxiques . Ces courbes sont en effet établies dans des conditions réelles , beaucoup plus proches de celles de dosage que celles réalisées par le simple mélange du toxique avec le bromure de potassium en poudre. D'ailleurs , nous avons pu nous rendre compte que ce mode de préparation des échantillons de référence demande moins de temps et moins de travail que la méthode par trituration de poudres .

Nous indiquons dans les tableaux n° 5 et 6 (page 98) les données relatives aux courbes de référence obtenues par évaporation de solutions acétoniques de toxiques étudiés .

c) erreur provenant de l'élution des spots

Il était à prévoir que l'élution par l'acétone des spots de toxiques absorbés sur les grains de silice ne se ferait pas sans perte et que ces pertes varieraient d'un toxique à l'autre puisqu'elles sont influencées par plusieurs facteurs , notamment la solubilité du toxique dans l'acétone et sa rétention par la silice .

Afin d'évaluer la perte engendrée au cours de l'élution des spots de toxiques , nous avons préparé des séries de spots en déposant des volumes de solution correspondant à des quantités de toxiques de 20 , 40 , 60 et 80 µg , sur des plaques de chromatographie recouvertes d'une couche de silice de trois dixièmes de millimètre d'épaisseur . Pour éliminer les causes d'erreur provenant de la migration des spots et de leur repérage , nous avons déposé les solutions de toxiques sur une surface de silice de 1,5 cm^2 , parfaitement délimitée . Cette surface correspond sensiblement à celle qu'il faut traiter par l'acétone pour éluer des spots réels obtenus à l'issue d'une séparation chromatographique . Ensuite , sans procéder au développement , nous avons détaché la silice sur la plage correspondant aux spots comme il est indiqué dans le mode opératoire (page 31) . Le dosage des toxiques a été effectué en prenant comme base de référence les courbes préparées par évaporation de toxique dans des microcupules de bromure de potassium.

Les résultats de ces essais sont réunis dans les tableaux n° 8 et 9 (page 110) . Ils nous ont permis d'établir une classification des toxiques en fonction de l'importance des erreurs apportées par l'élution des spots des chromatogrammes . Cette classification est indiquée dans les tableaux n° 10 et 11 (page 119 à 122) .

Sept toxiques (aconitine , α-narcotine , papavérine , cocaïne , phénobarbital , diazepam et méprobamate) ont été élués avec des pertes minimes , en moyenne inférieures à 5 p. 100 . Pour les autres

toxiques , les pertes consécutives à l'élution s'échelonnent entre 5 et 15 p. 100 . Enfin, pour trois produits , l'élution introduit une erreur considérable atteignant 30 et même 50 p. 100 (atropine , imipramine , nialamide) . Il est probable que la faible solubilité de ces toxiques dans l'acétone est responsable des pertes constatées . Sans doute serait-il possible de réaliser une élution plus quantitative en recourant à des solvants mieux appropriés tels que l'éthanol pour l'imipramine et l'atropine ou le méthanol pour la morphine . Mais nous avons déjà signalé les inconvénients qui peuvent résulter de l'emploi de ces solvants : point d'ébullition plus élevé , dissolution d'impuretés et risque d'attaque de la microcupule . Dans le but de limiter l'erreur apportée par l'élution , il semble préférable de recourir au procédé qui consiste à établir des courbes de référence en éluant , suivant le mode opératoire indiqué pour le dosage , des quantités connues de toxiques déposés sous forme de spots sur une couche mince de silice . Cette solution présente l'inconvénient d'exiger des manipulations plus longues et plus délicates, mais elle permet d'obtenir des résultats plus proches des valeurs réelles. De toute façon étant donné l'excellente conservation des pastilles ce travail ne doit être exécuté qu'une fois pour chaque toxique .

Nous donnons dans les tableaux n° 12 et 13 (page 123) quelques exemples des courbes de référence préparées de cette façon en vue du dosage des toxiques dans l'urine qui fait l'objet du paragraphe suivant .

- V -

APPLICATION DE LA METHODE PROPOSEE A L'IDENTIFICATION ET AU DOSAGE DE QUELQUES TOXIQUES DANS L'URINE

La méthode proposée a été appliquée à un problème toxicologique courant : l'identification et le dosage de quelques toxiques organiques non volatils dans l'urine .

Nous sommes partis d'échantillons d'urine auxquels nous avons ajouté des quantités connues d'alcaloïdes , de psycholeptiques ou de psychoanaleptiques . Dans le cas des alcaloïdes , nous n'avons ajouté qu'un toxique par échantillon d'urine , tandis que les produits psychotropes ont été ajoutés sous forme de mélanges en proportions variables .

En premier lieu , nous avons procédé à l'isolement des toxiques par extraction des psychotropes au moyen de l'éther en milieu acide et des alcaloïdes à l'aide du chloroforme ou l'éther en milieu alcalin . Les résidus d'évaporation de " l'éther acide " ou de " l'éther alcalin " ont été purifiés par chromatographie sur couche mince de silice suivant la technique que nous avons décrite dans le mode opératoire , (page 28) . Les spots ont été élués et les toxiques identifiés et dosés suivant la méthode que nous proposons . Nous avons réuni dans le tableau n° 14 les résultats de ces analyses , et nous indiquons pour chacun des toxiques les erreurs totales inhérentes à l'ensemble des manipulations (Tableau n° 14 , page 128).

L'examen de ce tableau fait ressortir l'importance des pertes , qui peuvent atteindre dans certains cas 65 p. 100 et sont sans commune mesure avec la marge d'erreur que nous avons calculée pour la méthode proprement dite qui débute au stade de l'élution des spots . Il faut donc admettre que les pertes de toxiques se produisent au cours des opérations préliminaires : extraction et chromatographie sur couche mince de silice . Pour nous assurer que la précision de la méthode n'est pas en cause , nous avons rapporté les valeurs d'absorbance intégrée à des courbes de référence obtenues soit par évaporation de solutions acétoniques dans des microcupules de bromure de potassium (méthode 1) , soit par élution de spots sur couche mince de silice (méthode 2) qui , ainsi que nous l'avons souligné , apporte une meilleure garantie en matière de précision . Les différences entre les résultats obtenus par la méthode 1 et la méthode 2 sont dans l'ensemble minimes et pratiquement négligeables par rapport à l'erreur globale .

Il est généralement admis que l'extraction des toxiques acides ou alcalins à partir de l'urine peut être effectuée avec un rendement de l'ordre de 90 p. 100 . Il apparaît donc que la chromatographie est responsable de la plus grande partie des pertes que nous avons enregistrées . Il est vraisemblable qu'une fraction des toxiques doit être perdue au cours de la chromatographie sous forme de traînée très discrètement colorée par les réactifs révélateurs .

Au cours de ces expériences sur le dosage des toxiques dans l'urine, nous avons eu l'occasion de constater à plusieurs reprises la présence de taches aberrantes sur les chromatogrammes , principalement lorsqu'il s'agissait d'alcaloïdes . Des spots prennent sous l'action de l'iodoplatinate de Potassium une teinte rouge ou violacée . Certains de ces spots ont été traités de la même façon que ceux contenant les alcaloïdes . L'examen dans l'infrarouge des micropastilles correspondantes a toujours révélé qu'il s'agissait de produits dont les spectres ne présentent aucun caractère commun avec celui de l'alcaloïde ajouté à l'urine . L'existence de ces spots peut évidemment entraîner des confusions lorsqu'on se base uniquement sur la méthode chromatographique pour identifier un toxique ou ses métabolites extraits d'un milieu biologique . L'emploi de la spectrométrie infrarouge permet d'éviter de telles erreurs .

CONCLUSION

Dans le dessein d'appliquer la méthode spectrométrique infrarouge à l'analyse des toxiques organiques non volatils présents dans les milieux biologiques, nous avons étudié et mis au point une méthode qui permet de réaliser simultanément leur identification et leur dosage .

La sensibilité de la spectrométrie infrarouge aux impuretés qui accompagnent toujours en quantité importante les toxiques extraits des milieux biologiques impose de les soumettre à une purification préalable , qui peut être réalisée , d'une manière commode et efficace , par une technique chromatographique sur couche mince de silice.

Diverses opérations nous permettent de transférer quantitativement dans une micropastille de bromure de potassium les très faibles quantités de produit qui sont contenues dans un spot de chromatogramme . Après avoir localisé les spots par fluorescence en lumière ultraviolette ou par analogie de R_f avec un chromatogramme parallèle révélé à l'aide d'un réactif approprié , la silice correspondant à l'emplacement de chaque spot est recueillie dans une allonge . Le toxique est élué par l'acétone , l'éluat obtenu est évaporé dans une microcupule de bromure de potassium préparée spécialement . La microcupule est ensuite pulvérisée et une partie aliquote de la poudre obtenue sert à préparer la micropastille qui est examinée par spectrométrie infrarouge . Les caractéristiques techniques des appareils que nous avons dû réaliser pour effectuer ces micromanipulations ainsi que le détail des opérations que nous avons dû mettre au point sont précisés dans notre travail .

Cette méthode est relativement simple si l'on considère que ces manipulations permettent de rechercher tous les toxiques en même temps . Elle permet d'identifier avec certitude un produit dans un spot de chromatogramme , lorsqu'il s'y trouve en quantité supérieure à 10 microgrammes , et de le doser avec une précision qui varie de 5 à 20 p. 100 . L'erreur semble être liée à l'impossibilité d'éluer complètement le toxique fixé sur la silice , car l'évaporation de l'éluat dans la microcupule s'effectue pratiquement sans perte .

L'application à des échantillons d'urine contenant des quantités connues de toxiques est moins satisfaisante : aux erreurs indiquées précédemment s'ajoutent des erreurs plus importantes inhérentes aux opérations préliminaires d'extraction et de purification .

La méthode que nous proposons présente un caractère général : elle permet , en une seule série d'opérations , la recherche et le dosage de plusieurs toxiques organiques non volatils et celà dans divers milieux . En outre , la spécificité apportée par la spectrométrie infrarouge et la facilité du dosage sont d'un intérêt tout particulier dans l'expertise toxicologique médicolégale pour faire la preuve irréfutable de la présence d'un ou de plusieurs toxiques . En effet , on doit redouter , et nous l'avons constaté à plusieurs reprises avec des urines , l'extraction de substances fournissant des spots révélables par les réactifs usuels des toxiques recherchés , mais ne présentant aucune parenté avec ces composés .

La méthode peut trouver d'autres applications dans l'étude des métabolites des toxiques et des médicaments organiques , ou dans l'identification et le dosage de nombreux produits biologiques séparables par chromatographie en couche mince .

ANNEXE I

Figures

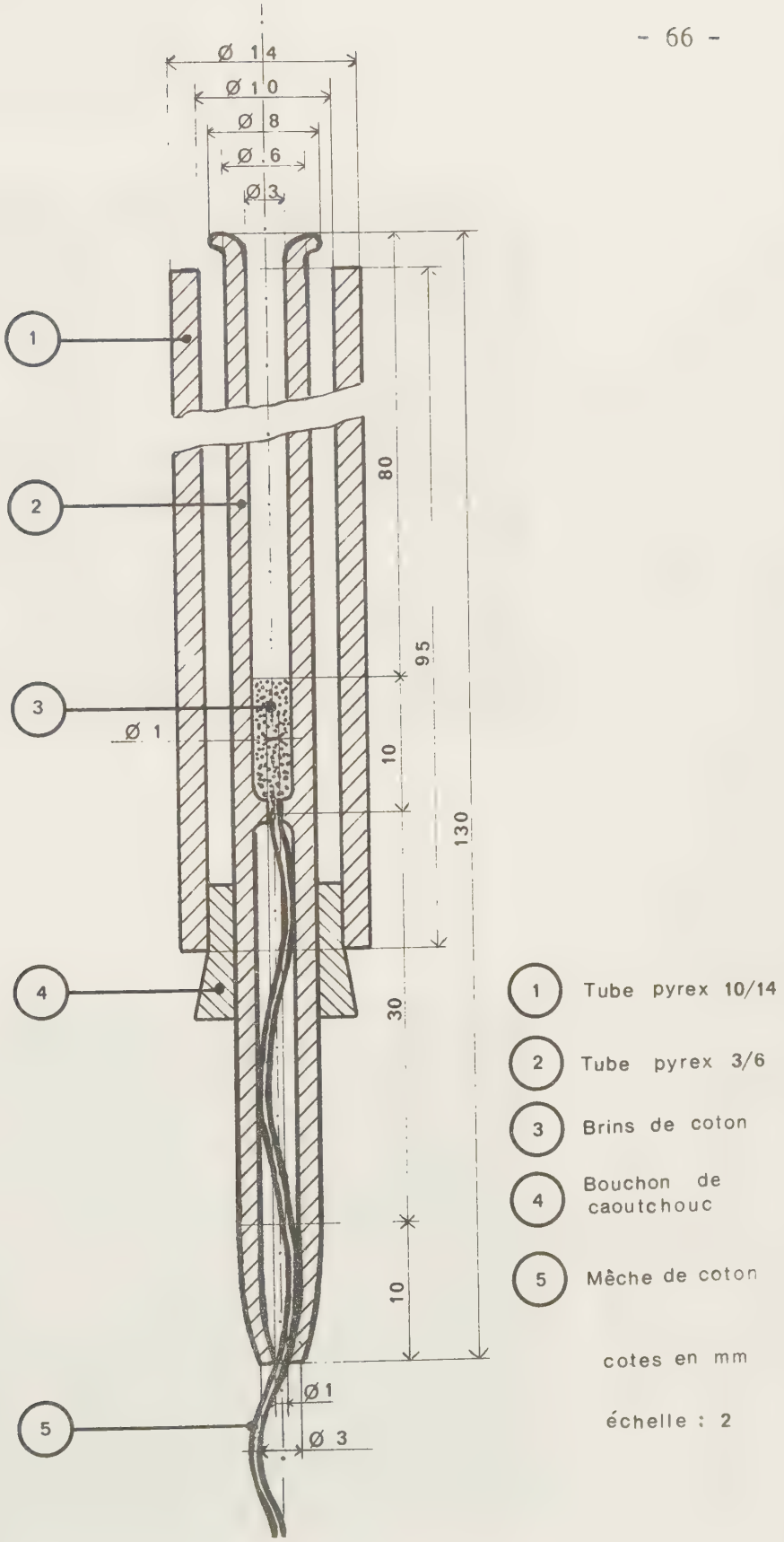


Figure n° 1

Dispositif d'élution

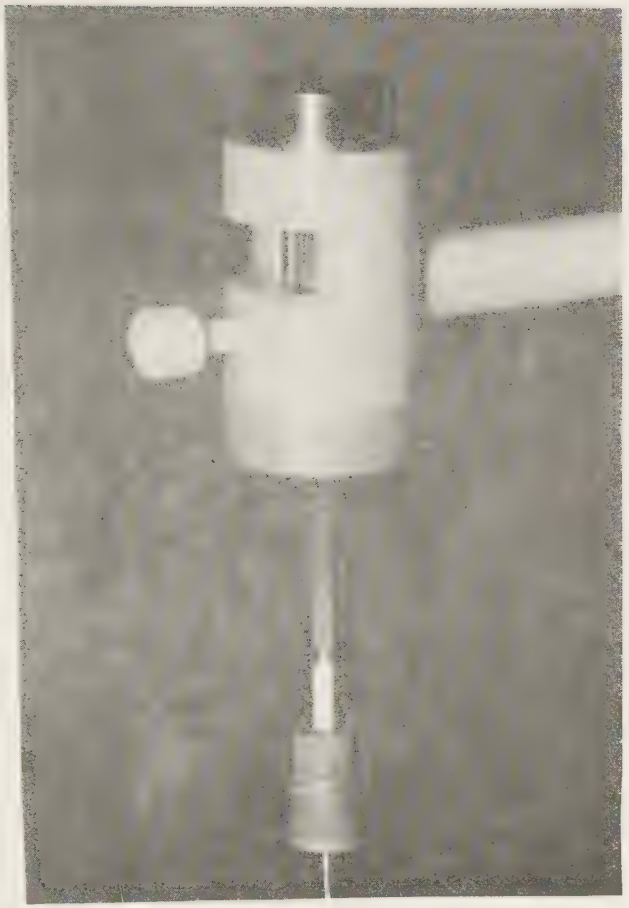


Figure n° 2

Dispositif de remplissage des allonges



Figure n° 3

Dispositif d'élution

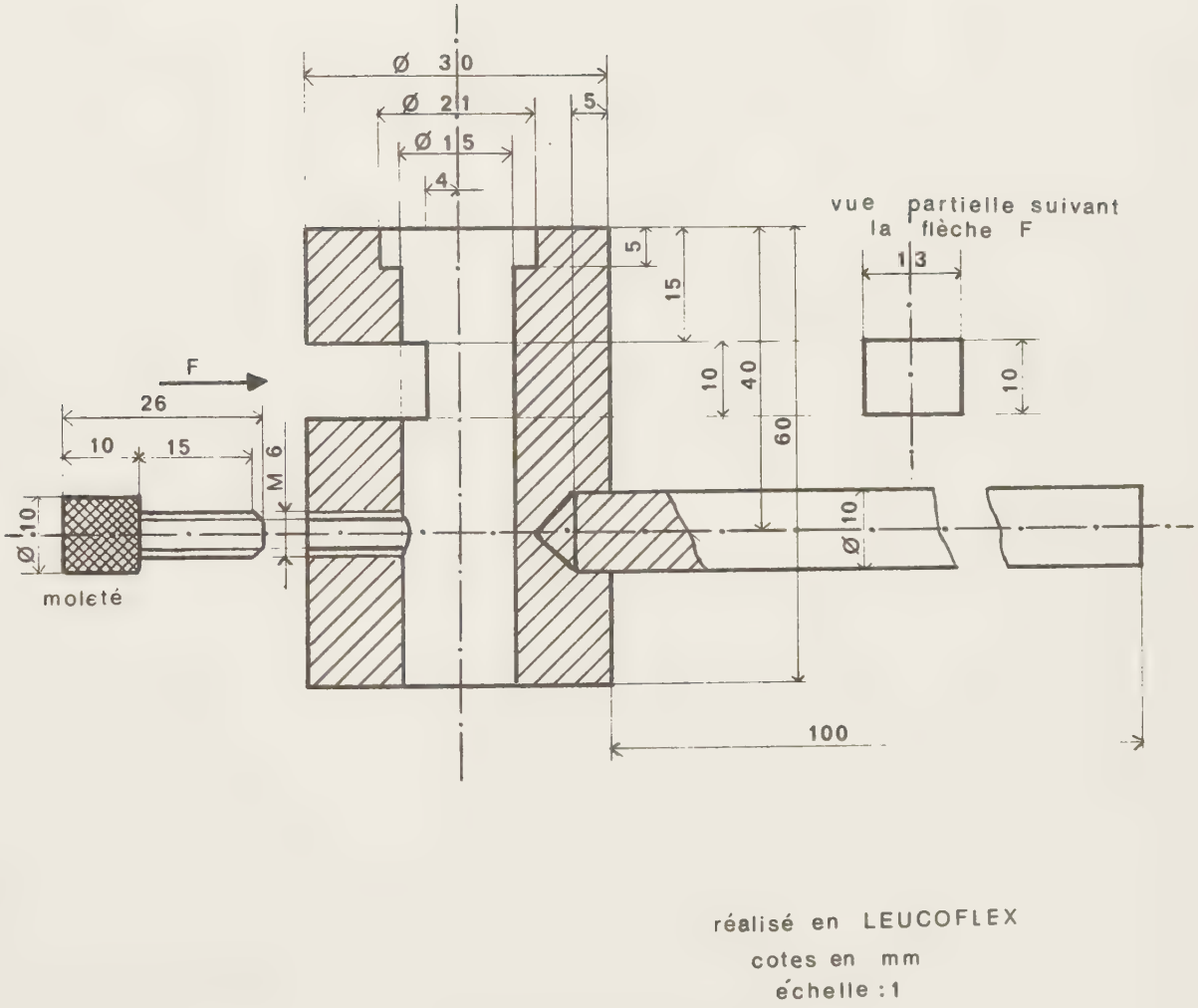


Figure n° 4

Support pour le remplissage des allonges

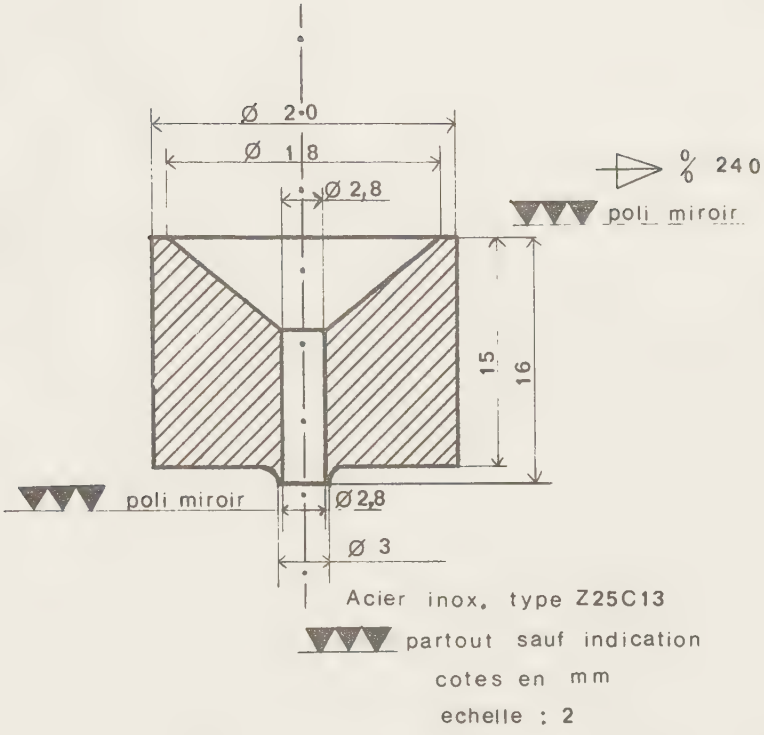


Figure n° 5

Entonnoir pour le remplissage des allonges

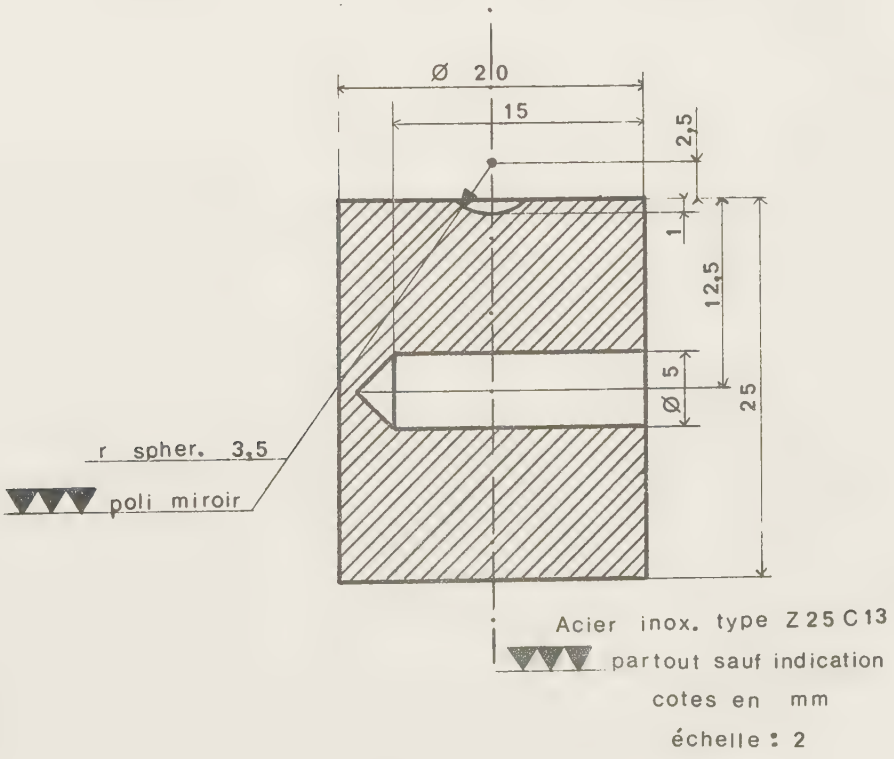


Figure n° 6

Support pour l'évaporation des éluats

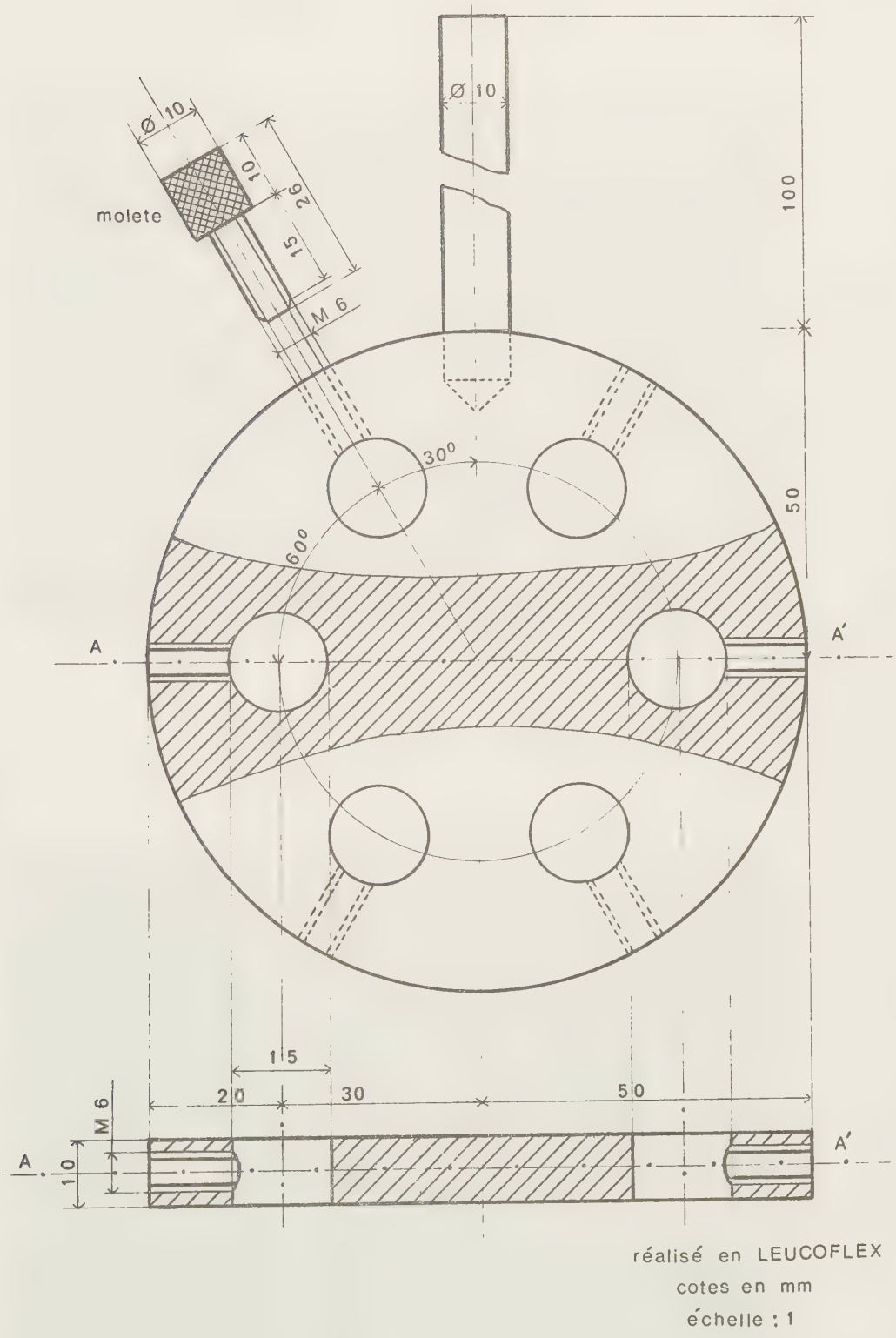


Figure n° 7

Support pour six allonges d'élution



Figure n° 8

Microcupules de bromure de potassium
avec le moule servant à les fabriquer

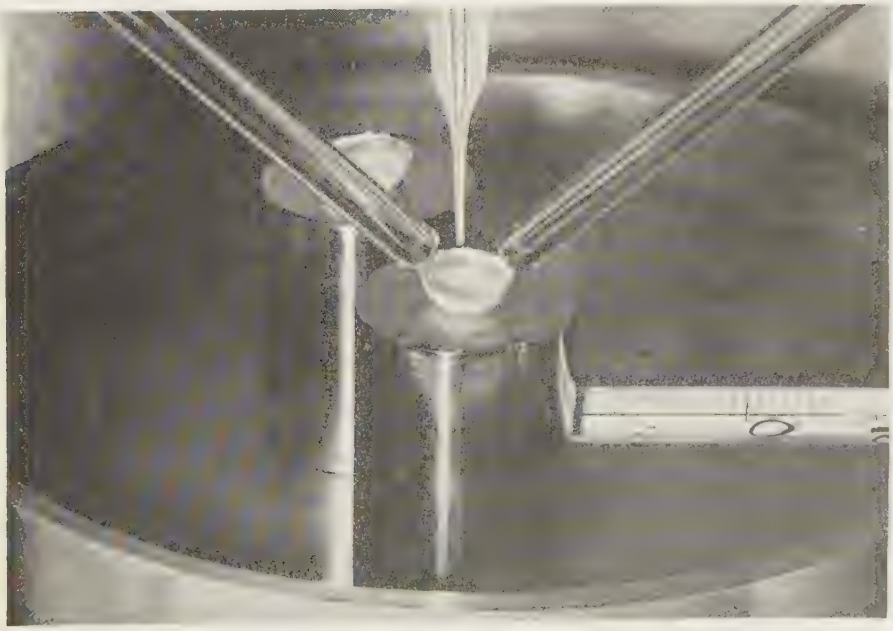


Figure n° 9

Dispositif d'évaporation des éluats

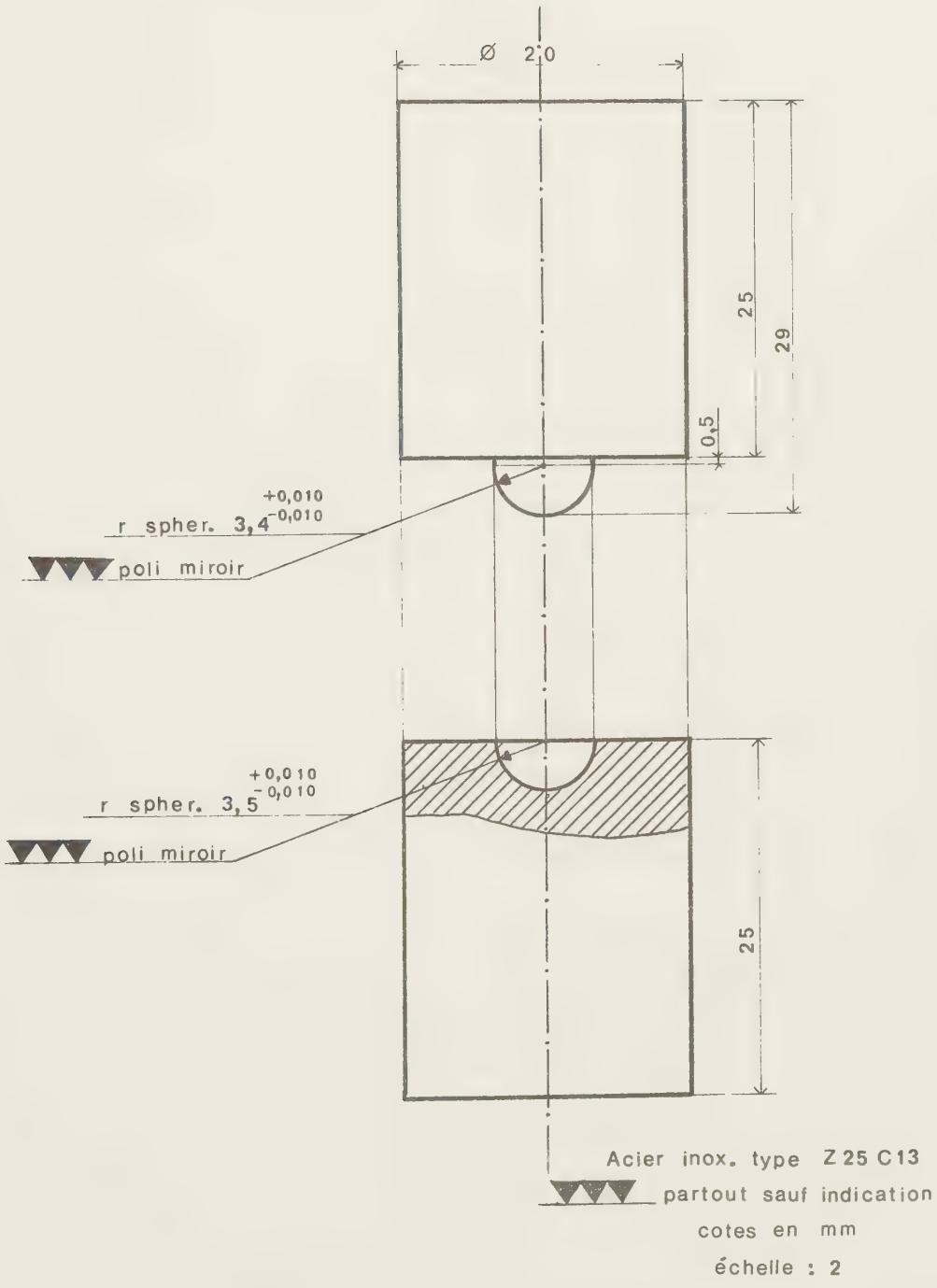


Figure n° 10

Moule de fabrication des microcupules

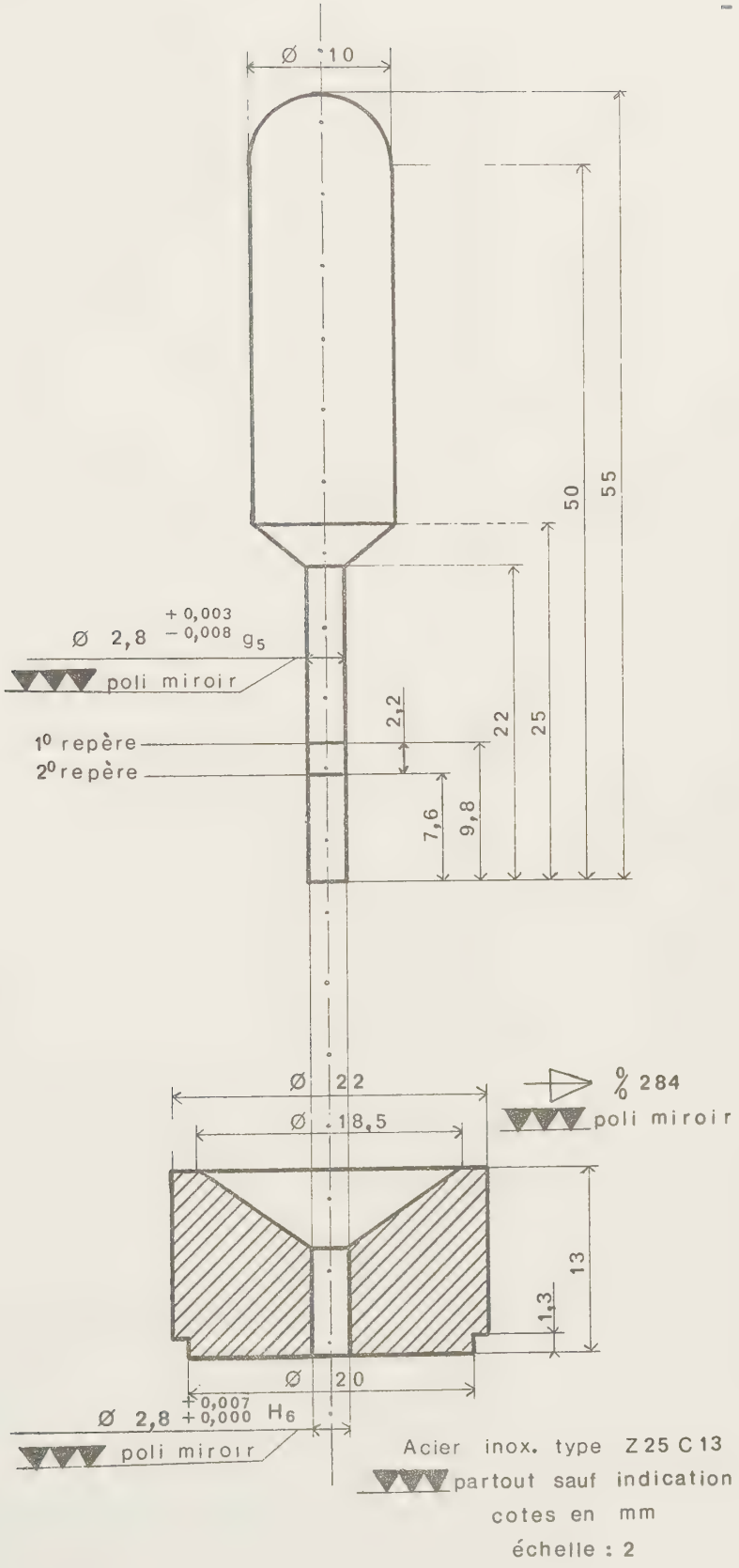


Figure n° 11

Dispositif de remplissage des micropastilles
(système LEITZ modifié)

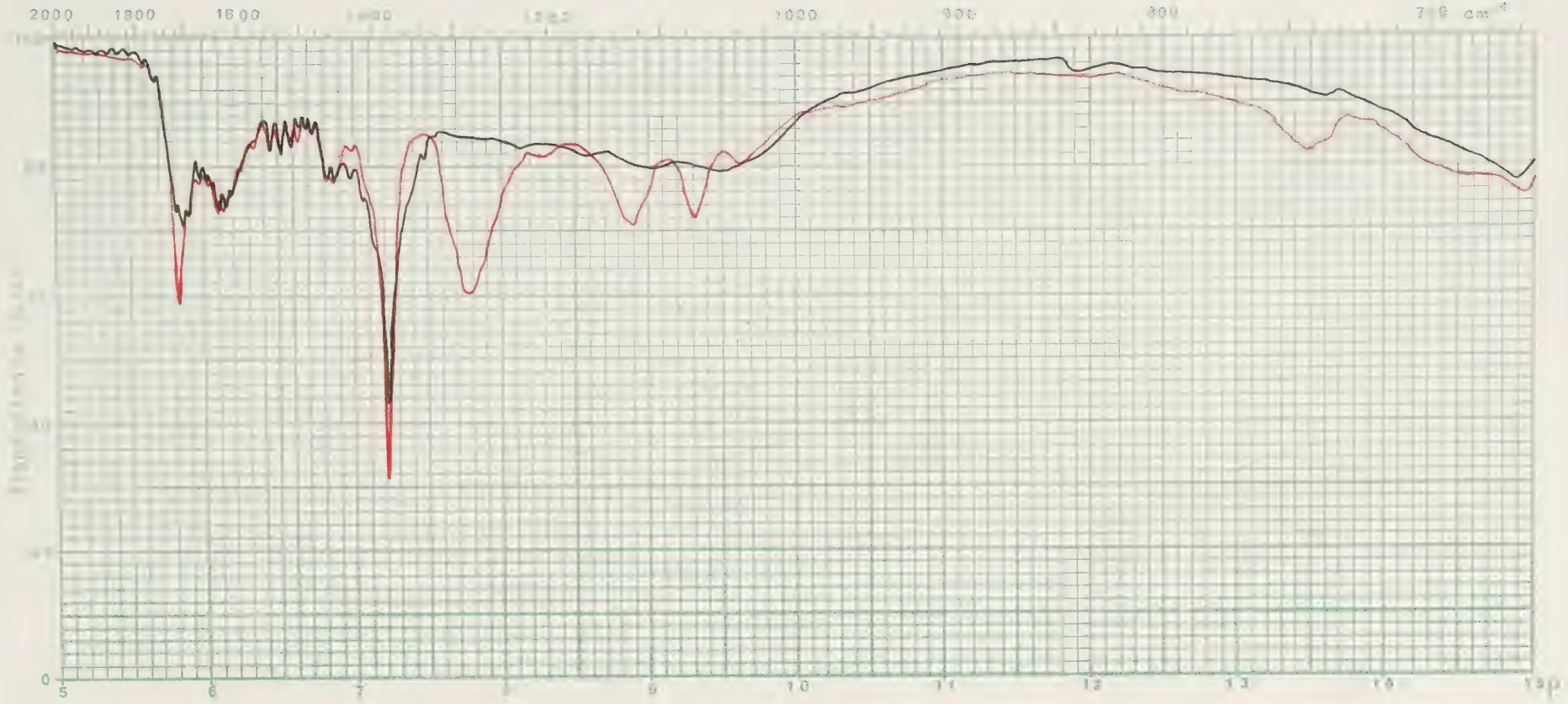


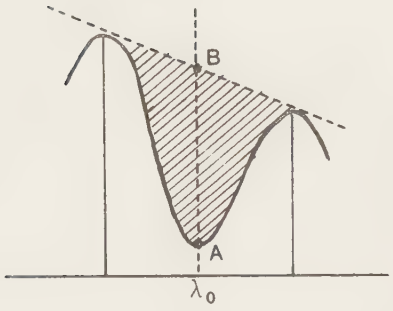
Figure n° 12

Spectres des impuretés éluées de la silice G

—— substances éluées de 100 mg. de silice non lavée aux solvants

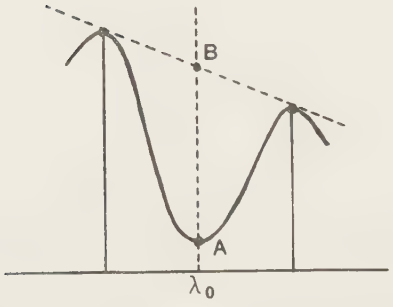
—— substances éluées de 30 mg. de silice préalablement lavée aux solvants

Figure n° 13

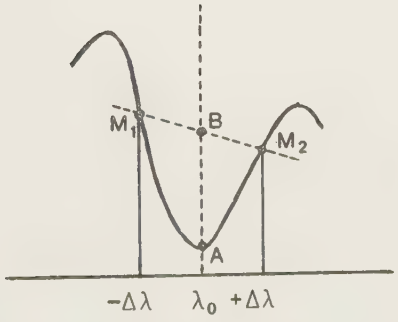


Méthode de calcul de l'absorbance intégrée

Figure n° 14



a) Méthode de la ligne de base selon WRIGHT



b) Méthode de la ligne de base selon PIRLOT

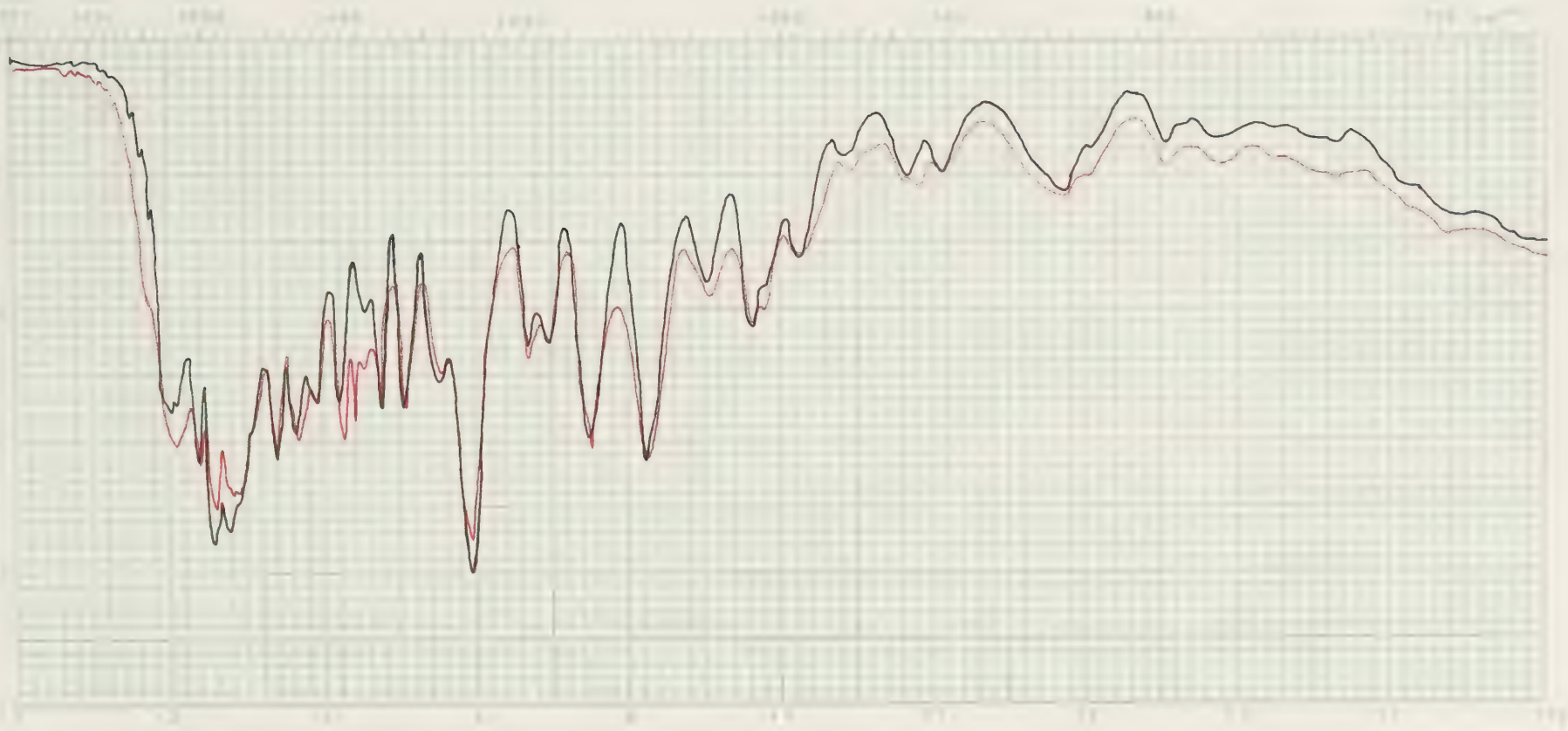


Figure n° 15

Spectres de la colchicine

— spectre obtenu après évaporation d'une solution contenant 40,0 µg de produit

—spectre obtenu après élution d'un spot sur silice contenant 39,5 µg de produit



Figure n° 16

Spectres de la diamorphine

— spectre obtenu après évaporation d'une solution contenant 37,5 µg de produit

— spectre obtenu après élution d'un spot sur silice contenant 40,5 µg de produit

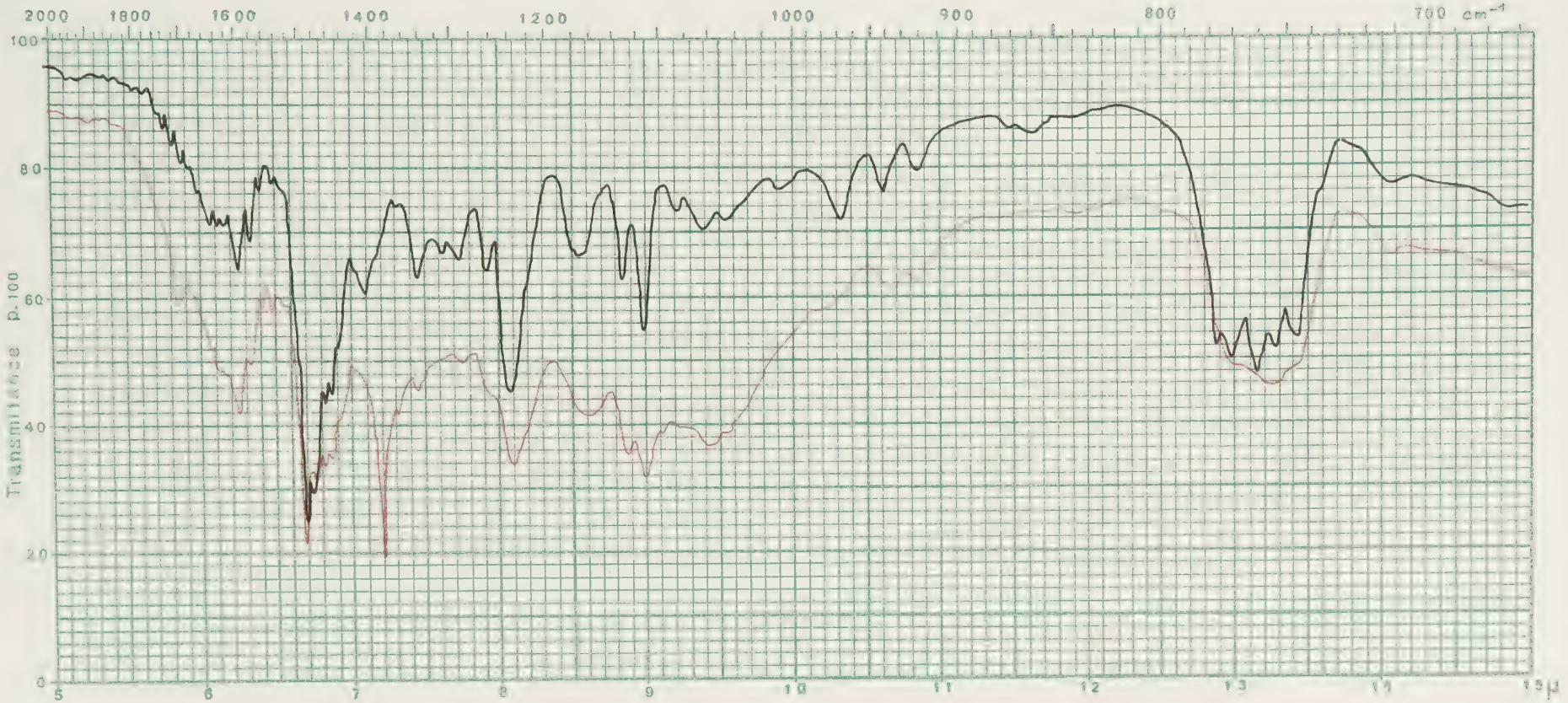


Figure n° 17

Spectres de l'imipramine

—— spectre obtenu après évaporation d'une solution contenant 39,5 µg de produit

—— spectre obtenu après élution d'un spot sur silice contenant 41,0 µg de produit

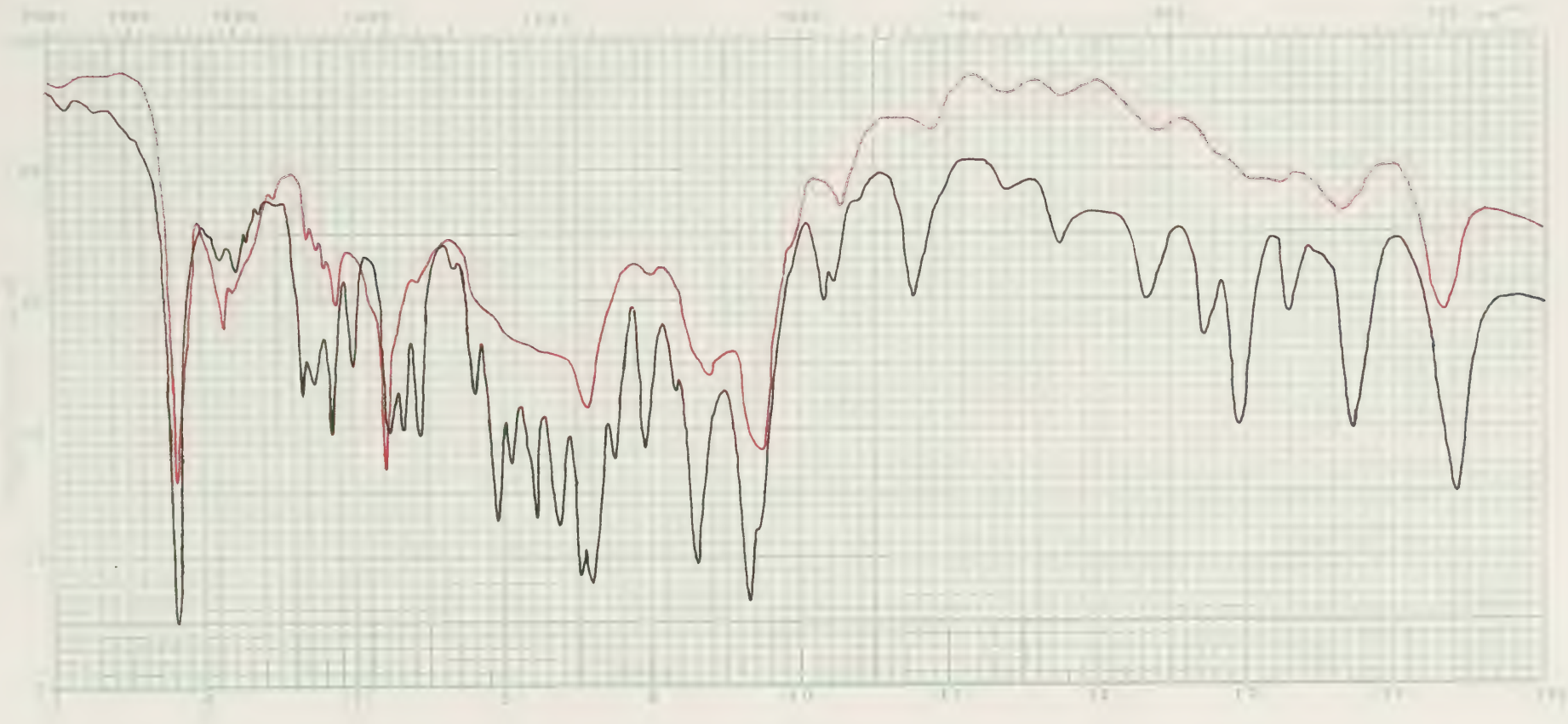


Figure n° 18

Spectres de l'atropine

—— spectre obtenu après évaporation d'une solution contenant 40,0 µg de produit

—— spectre obtenu après élution d'un spot sur silice contenant 39,5 µg de produit

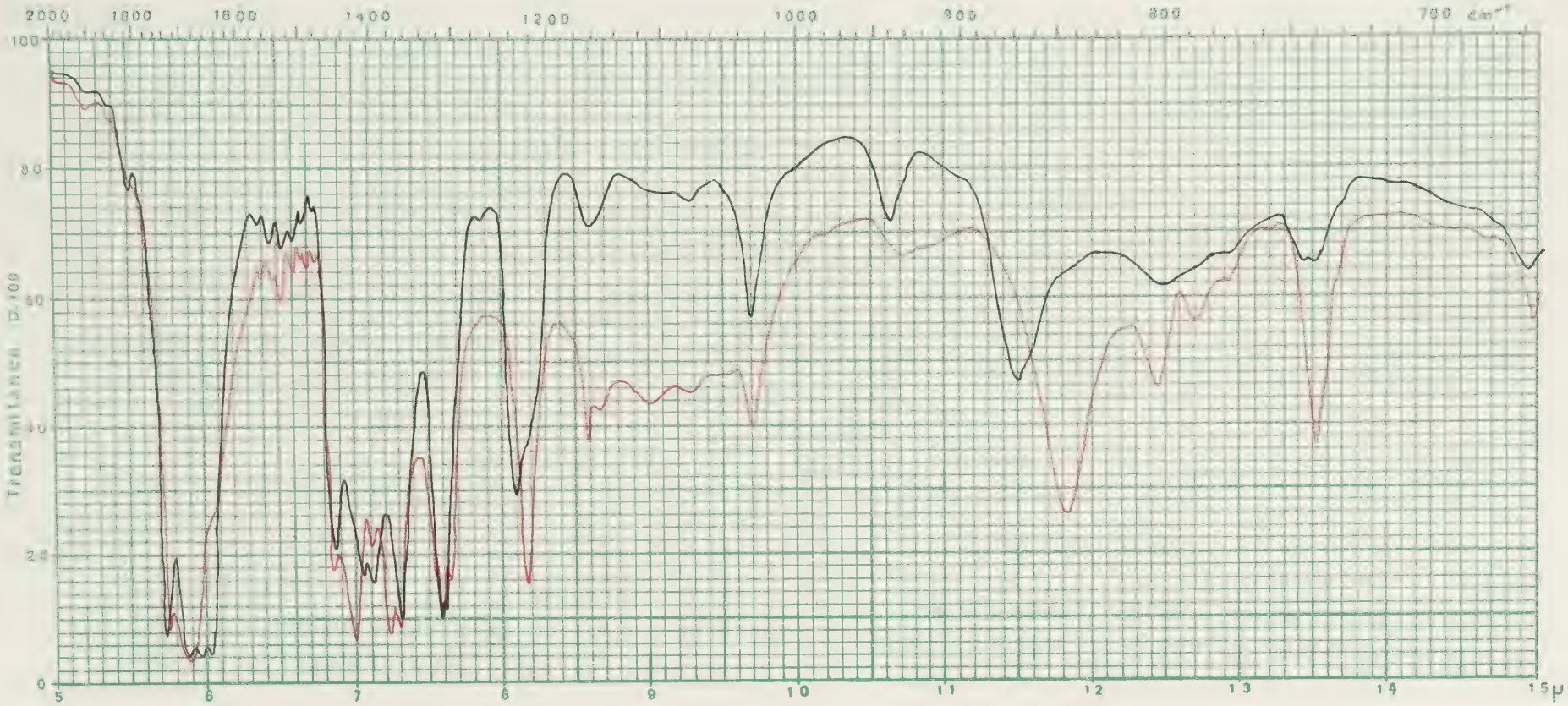


Figure n° 19

Spectres du barbital

— spectre obtenu après évaporation d'une solution contenant 42,5 µg de produit

— spectre obtenu après élution d'un spot sur silice contenant 40,0 µg de produit

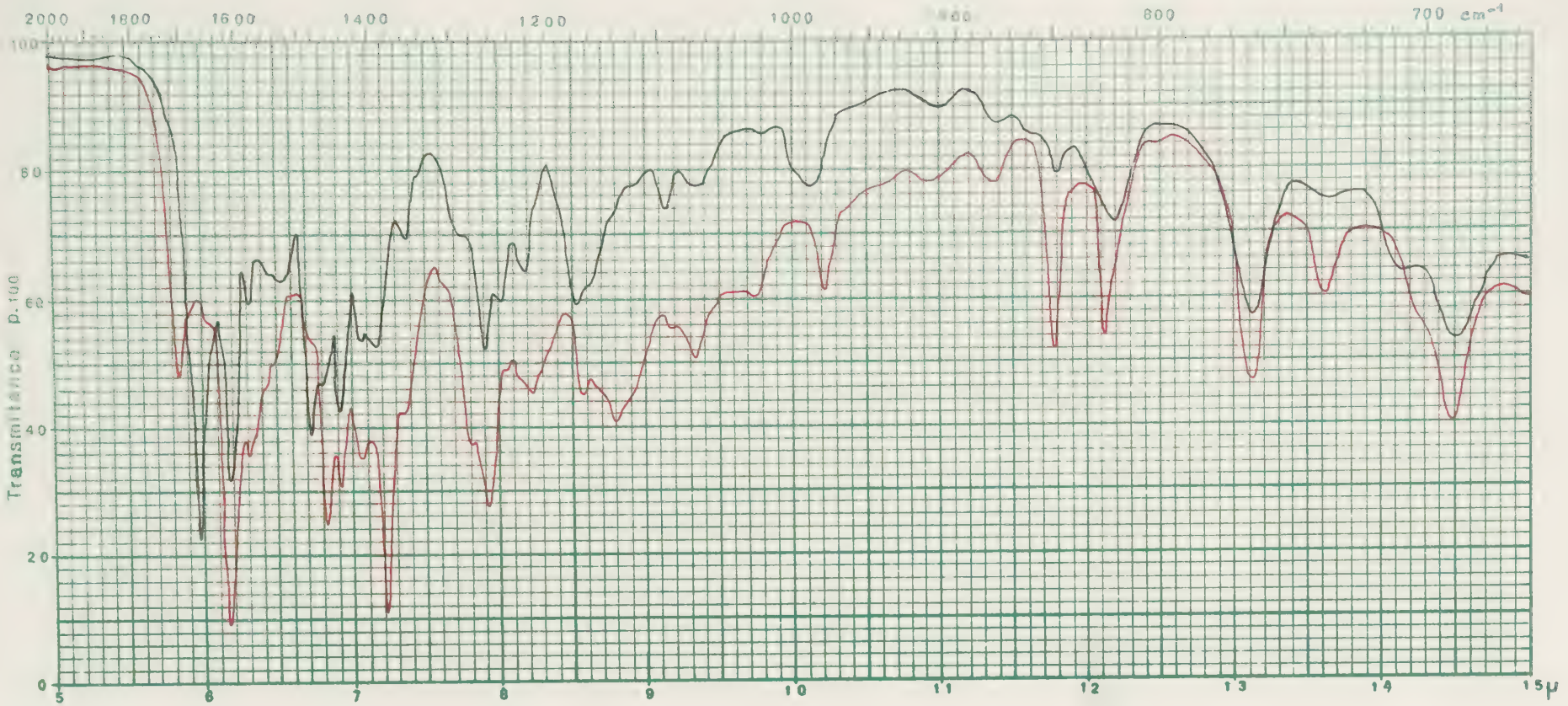


Figure n° 20

Spectres du chlordiazepoxide

— spectre obtenu après évaporation d'une solution contenant 41,0 µg de produit

— spectre obtenu après élution d'un spot sur silice contenant 41,0 µg de produit

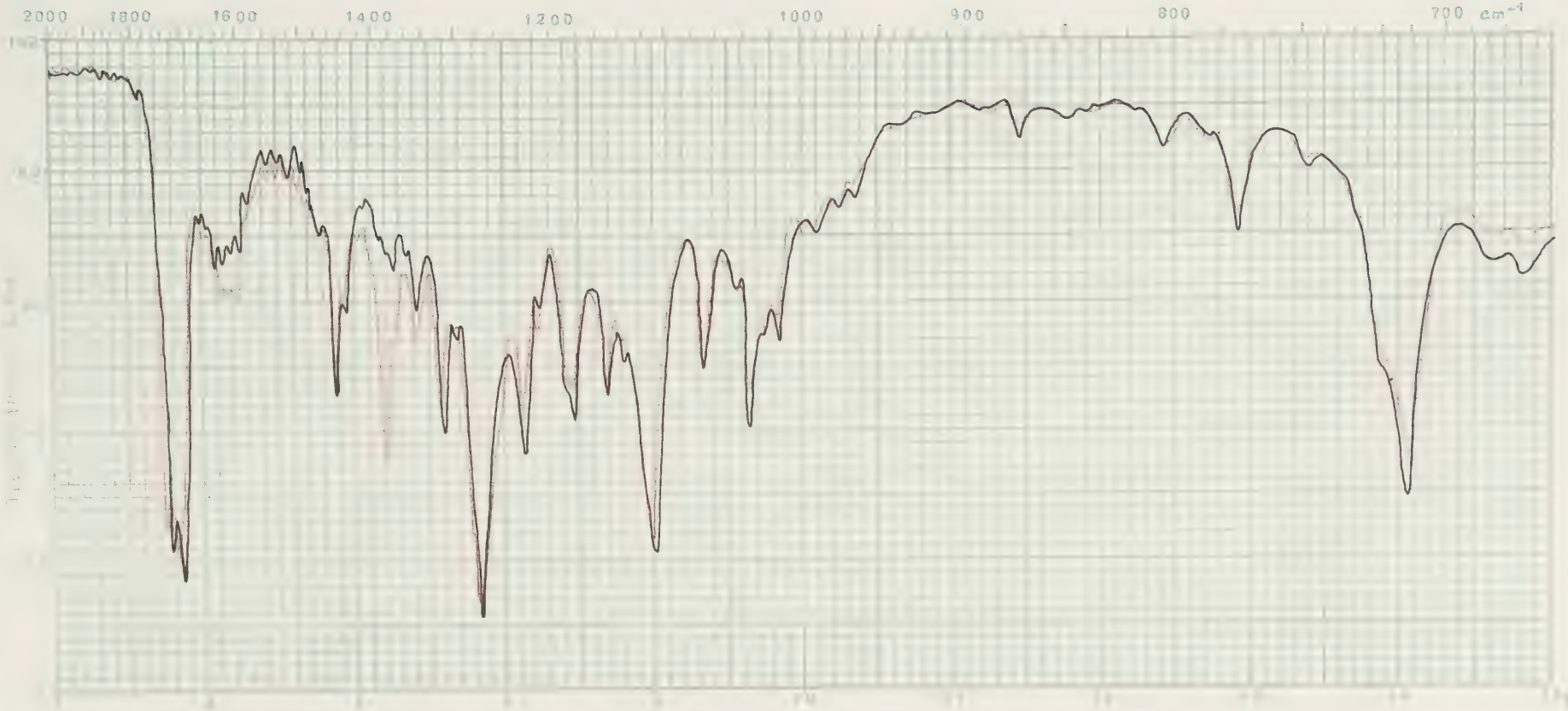


Figure n° 21

Spectres de la cocaïne

—— spectre obtenu après évaporation d'une solution contenant 39,5 µg de produit

—— spectre obtenu après élution d'un spot sur silice contenant 40,5 µg de produit

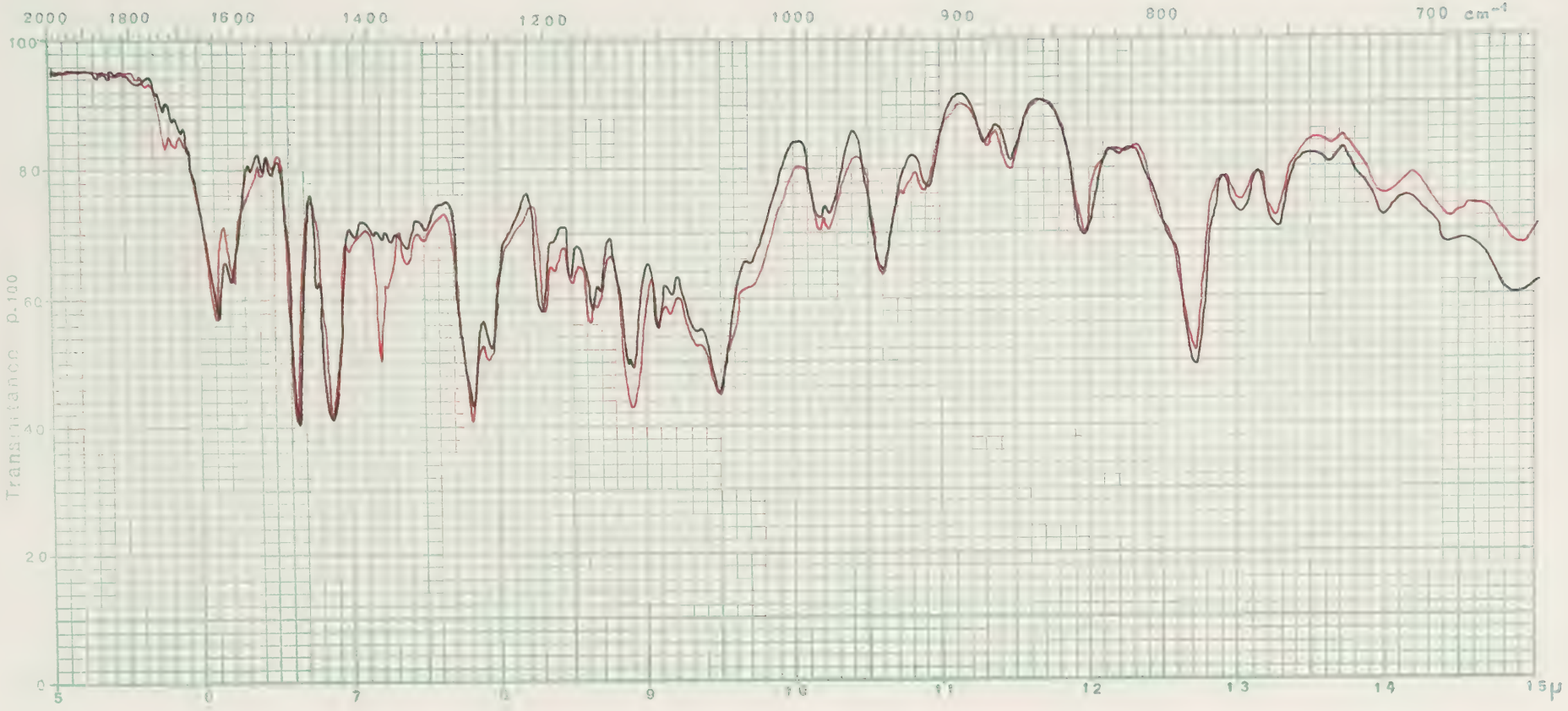


Figure n° 22

Spectres de la codéine

— spectre obtenu après évaporation d'une solution contenant 39,0 µg de produit

— spectre obtenu après élution d'un spot sur silice contenant 43,0 µg de produit

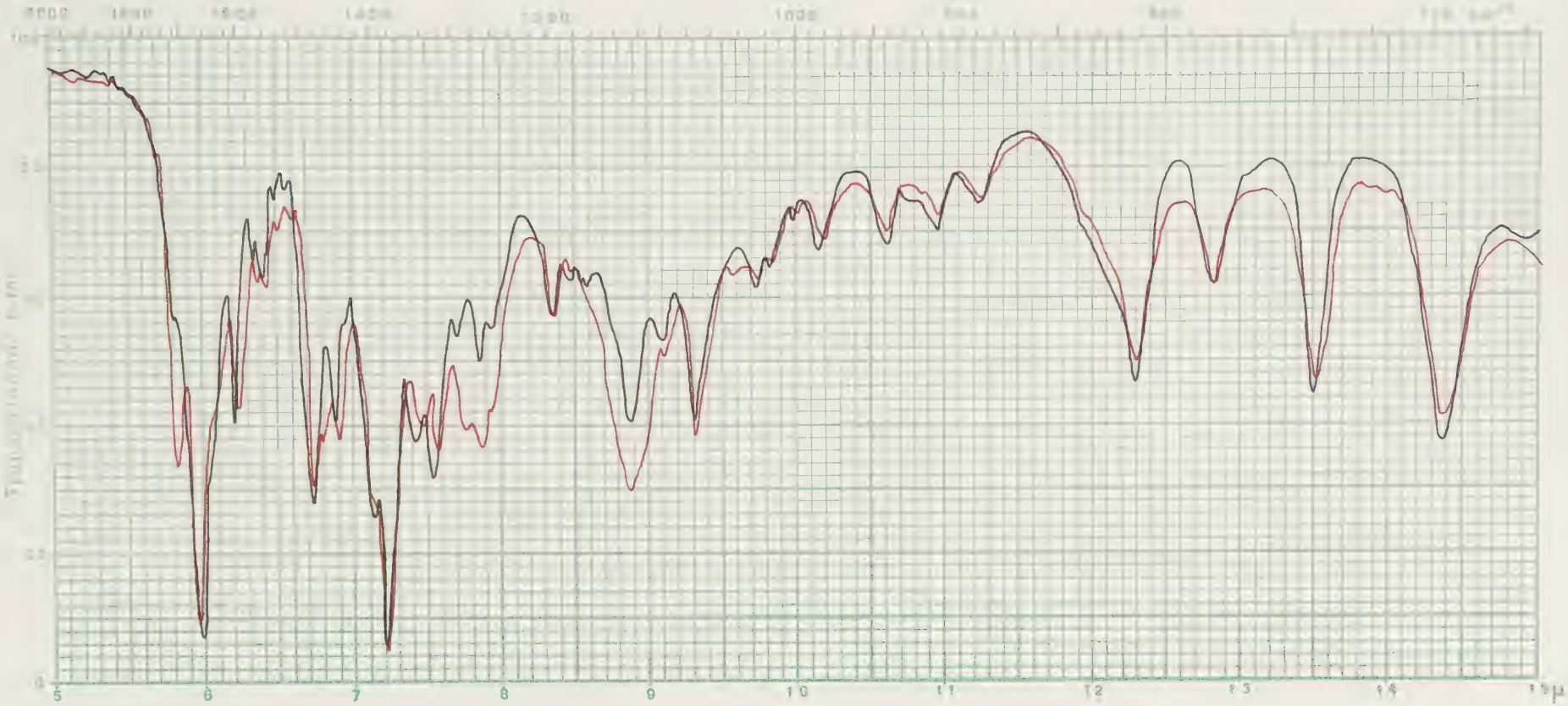


Figure n° 23

Spectres du diazepam

—— spectre obtenu après évaporation d'une solution contenant 41,5 µg de produit

—— spectre obtenu après élution d'un spot sur silice contenant 39,0 µg de produit

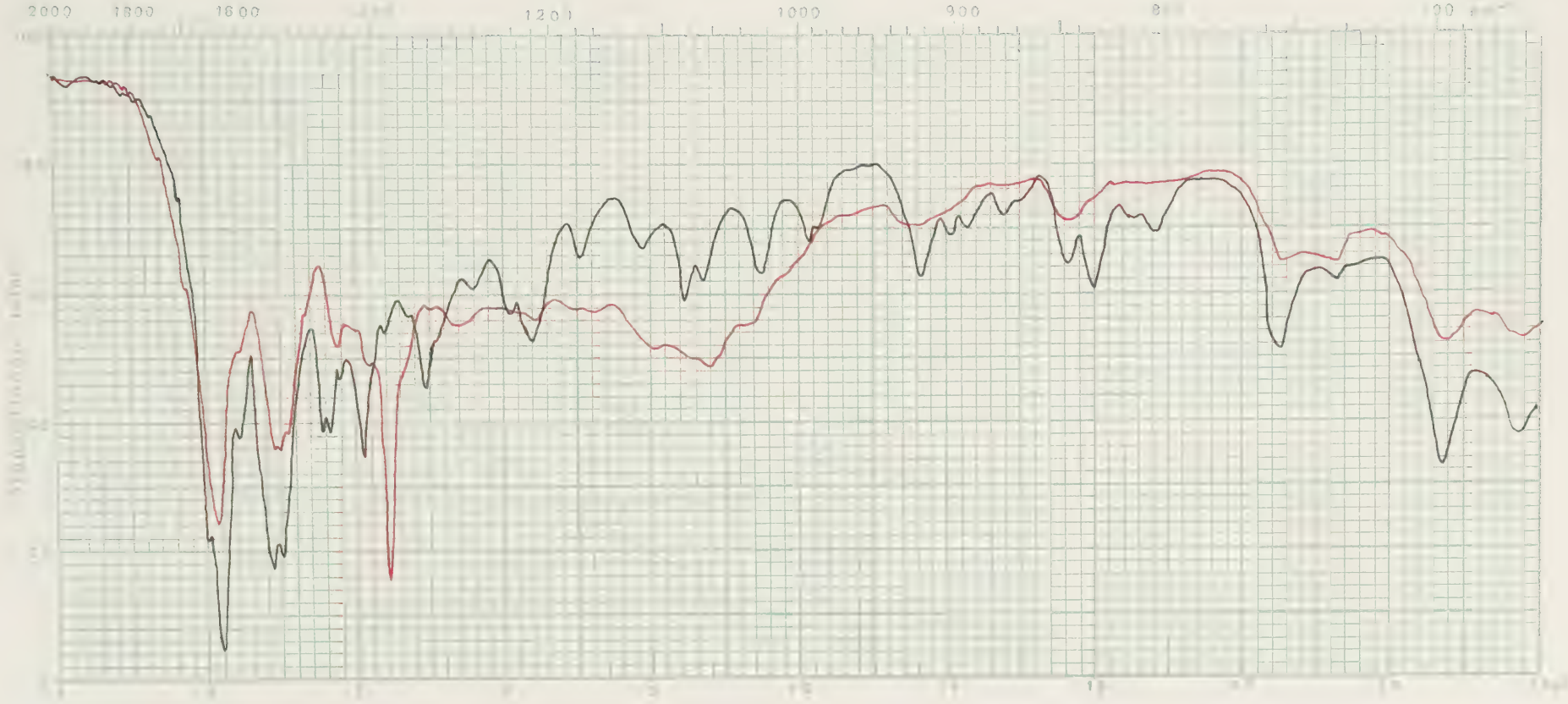


Figure n° 24

Spectres de la nialamide

—— spectre obtenu après évaporation d'une solution contenant 42,5 µg de produit

—— spectre obtenu après élution d'un spot sur silice contenant 45,5 µg de produit

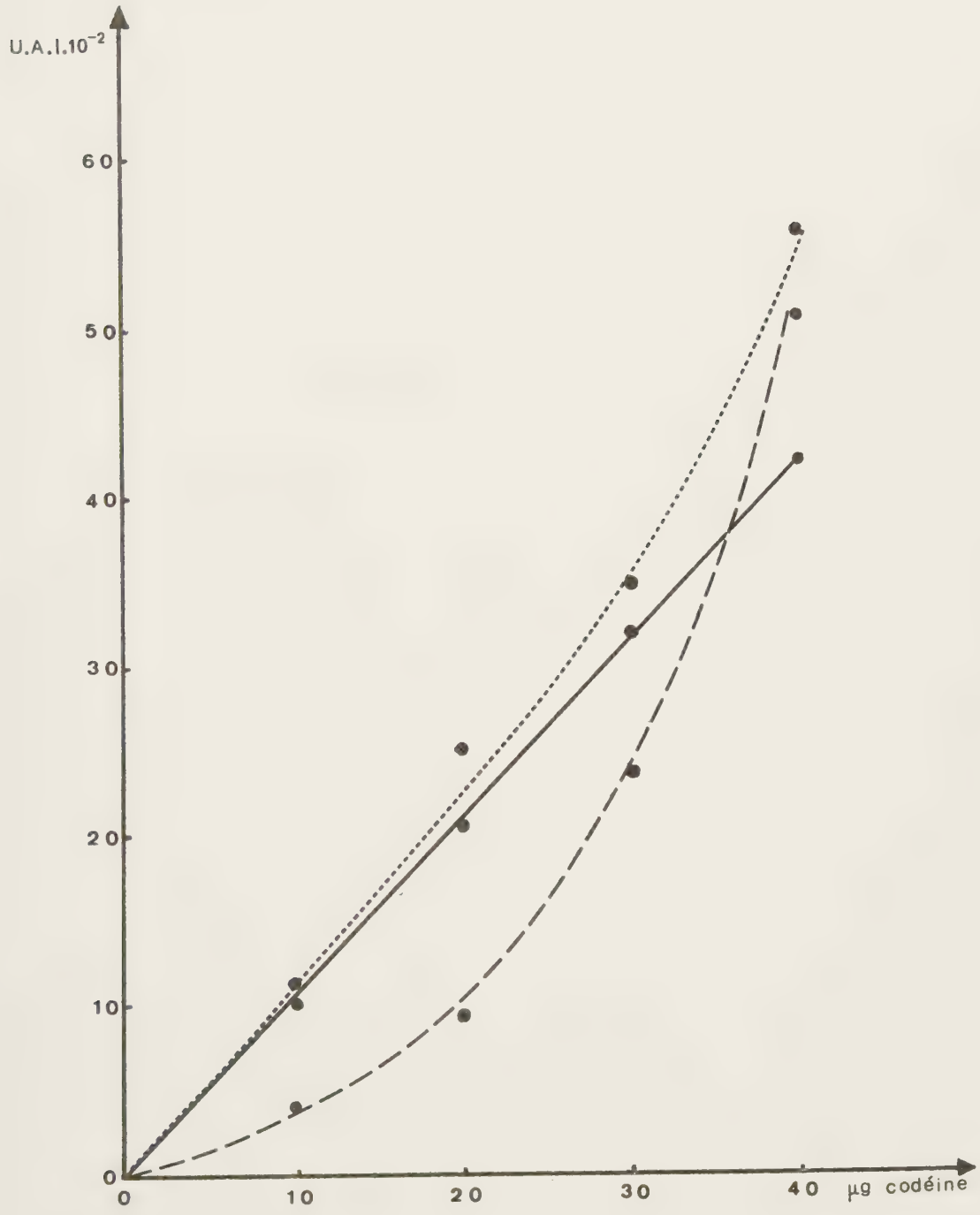


Figure n° 25

Courbes de référence de la codéine

------ $\int_{7,65}^{8,18}$ — — — $\int_{9,11}^{9,62}$ —— $\int_{12,30}^{12,90}$

ANNEXE II

Tableaux

Tableau n° 1

Données utilisables pour le dosage des alcaloïdes

Nature du toxique	Zone d'intégration - μ -	Position du maximum - μ -	Pente de la courbe de référence en U.A.I. 10^{-2}/μ g		
			Mélange en milieu solide	Evaporation de solutions acétoniques	Elution de spots sur silice
Aconitine	8,14 / 7,41	7,79	3,61	3,29	
	9,41 / 8,73	9,08	4,80	4,30	
	14,35 / 13,20	13,95	1,34		
Atropine	14,70 / 14,00	14,40	1,23	1,20	0,76
Brucine	8,63 / 7,48	7,79		3,45	2,89
	9,39 / 8,63	8,99		1,75	
Cocaïne	8,02 / 7,61	7,80	2,70	2,58	
Codéine	12,90 / 12,30	12,58	1,05	1,08	1,07

Tableau n° 1 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Position du maximum - µ -	Pente de la courbe de référence en U.A.I. 10^{-2}/µg		
			Mélange en milieu solide	Evaporation de solutions acétoniques	Elution de spots sur silice
α-Narcotine	8,11 / 7,48	7,77		3,15	
	10,12 / 9,06	8,94		5,93	
Papavérine	8,21 / 7,49	8,10	4,30	4,04	
Quinine	8,40 / 7,70	8,05		3,36	
Strychnine	13,60 / 12,55	13,10	1,92	2,16	2,07

Tableau n° 2

Données utilisables pour le dosage des psycholeptiques et des psychoanaleptiques

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Position du maximum - µ -	Pente de la courbe de référence en U.A.I. 10^{-2}/µg		
			Mélange en milieu solide	Evaporation de solutions acétoniques	Elution de spots sur silice
Amobarbital	$\int_{7,95}^{8,45}$	8,05		1,34	1,12
Barbital	$\int_{7,90}^{8,40}$	8,17		1,77	1,76
	$\int_{13,25}^{13,70}$	14,45			1,10
Chlordiazepoxide	$\int_{6,63}^{7,30}$	6,72 6,91		1,83	
	$\int_{7,55}^{8,34}$	7,90		1,47	
	$\int_{12,70}^{13,45}$	13,11		1,02	

Tableau n° 2 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Position du maximum - µ -	Pente de la courbe de référence en u.A.I. 10^{-2}/µg		
			Mélange en milieu solide	Evaporation de solutions acétoniques	Elution de spots sur silice
Diazepam	12,55 / 11,60	12,30		1,79	
	13,75 / 13,25	13,50		1,03	
	14,80 / 14,00	14,36			2,25
Glutéthimide	8,80 / 8,10	8,30		3,48	3,33
	13,50 / 12,70	13,11		1,06	1,00
Imipramine	7,02 / 6,47	6,71		2,41	1,82
	13,70 / 12,50	13,28		4,07	2,98

Tableau n° 2 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Position du maximum - µ -	Pente de la courbe de référence en U.A.I. 10^{-2}/µg		
			Mélange en milieu solide	Evaporation de solutions acétoniques	Elution de spots sur silice
Méprobamate	7,73 / 7,29	7,46		3,08	2,88
	9,85 / 9,00	9,32		4,25	
	13,10 / 12,40	12,72		0,81	
Nialamide	6,73 / 6,32	6,42		2,44	1,32
	14,00 / 12,90	13,30		1,41	0,90
	14,65 / 14,00	14,37		1,34	0,67
Phénobarbital	8,50 / 7,90	8,13		1,33	1,28
	13,70 / 12,25	13,38			1,30

Tableau n° 3

Transformations des spectres infrarouges consécutives

au passage des toxiques sur silice

sans modification	aconitine , amobarbital , brucine , glutéthimide , méprobamate ,morphine , α-narcotine , papavérine , phénobarbital , quinine , strychnine .
modifications minimes	colchicine , diamorphine , imipramine .
modifications notables	atropine , barbital , chlordiazepoxide , cocaïne , codéine , diazepam , nialamide.

Tableau n° 4

Courbes de référence des alcaloïdes

Micropastilles préparées par mélange en milieu solide

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Aconitine	[8,14 ; 7,41]	142,0	40,0	3,54	3,61
		109,5	30,0	3,65	
		72,0	20,0	3,60	
		37,0	10,0	3,72	
		17,5	5,0	3,47	
	[9,41 ; 8,73]	192,0	40,0	4,80	4,80
		134,5	30,0	4,49	
		89,0	20,0	4,42	
		49,0	10,0	4,89	
		25,0	5,0	4,96	
Atropine	[14,70 ; 14,00]	50,5	40,0	1,26	1,23
		37,0	30,0	1,22	
		24,0	20,0	1,17	
		11,5	10,0	1,16	

Tableau n° 4 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la microPastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Cocaïne	$\int_{7,61}^{8,02}$	110,0	40,0	2,75	2,70
		83,5	30,0	2,79	
		52,5	20,0	2,62	
		29,5	10,0	2,95	
Codéine	$\int_{12,30}^{12,90}$	42,5	40,0	1,06	1,05
		32,0	30,0	1,05	
		20,5	20,0	1,02	
		10,0	10,0	1,03	
Colchicine	$\int_{7,64}^{8,23}$	101,5	40,0	2,54	2,56
		77,0	30,0	2,58	
		52,5	20,0	2,62	
		19,5	10,0	1,93	

Tableau n° 4 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Diamorphine	$\int_{5,51}^{5,90}$	80,5	40,0	2,02	2,00
		59,5	30,0	1,99	
		41,5	20,0	2,06	
		18,0	10,0	1,80	
	$\int_{7,630}^{8,745}$	286,0	40,0	7,16	7,20
		217,0	30,0	7,24	
		148,0	20,0	7,40	
		70,0	10,0	7,00	
Papavérine	$\int_{7,49}^{8,21}$	172,0	40,0	4,31	4,30
		129,5	30,0	4,32	
		86,5	20,0	4,32	
		41,5	10,0	4,16	
Strychnine	$\int_{12,55}^{13,60}$	79,0	40,0	1,97	1,92
		57,5	30,0	1,91	
		39,0	20,0	1,95	
		19,5	10,0	1,96	

Tableau n° 5

Courbes de référence des alcaloïdes

Micropastilles préparées par évaporation de solutions acétoniques dans des microcupules de bromure de potassium

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Aconitine	$\int_{7,41}^{8,14}$	128,0	38,5	3,32	3,29
		101,0	31,0	3,27	
		65,0	20,5	3,20	
		32,0	10,0	3,20	
	$\int_{8,73}^{9,41}$	164,0	38,5	4,25	4,30
		134,5	31,0	4,33	
		87,0	20,5	4,25	
		46,0	10,0	4,49	
Atropine	$\int_{14,00}^{14,70}$	44,0	39,0	1,13	1,20
		36,0	29,5	1,22	
		23,0	20,0	1,15	
		13,0	11,0	1,19	

Tableau n° 5 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Brucine	$\int_{7,48}^{8,63}$	139,0	41,0	3,40	3,45
		106,0	30,5	3,45	
		69,0	20,5	3,39	
		38,5	10,5	3,62	
	$\int_{8,63}^{9,39}$	75,5	41,0	1,85	1,75
		59,5	30,5	1,94	
		34,5	20,5	1,68	
		18,0	10,5	1,72	
Cocaïne	$\int_{7,61}^{8,02}$	95,0	39,5	2,41	2,58
		77,0	29,0	2,62	
		54,0	22,0	2,46	
		26,0	10,5	2,54	
Codéine	$\int_{12,30}^{12,90}$	44,5	39,0	1,13	1,08
		33,0	30,0	1,09	
		24,5	21,5	1,14	
		11,5	10,5	1,09	

Tableau n° 5 (suite)

Nature du produit	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. $10^{-2}/\mu g$	
				calculée	mesurée sur le graphique
Colchicine	$\int_{7,64}^{8,23}$	103,0	38,5	2,69	2,65
		78,0	28,5	2,73	
		51,0	20,0	2,56	
		27,5	9,5	2,86	
Diamorphine	$\int_{5,51}^{5,90}$	73,2	38,0	1,99	2,10
		65,5	31,5	2,09	
		44,0	20,0	2,19	
		21,0	10,0	2,13	
	$\int_{7,630}^{8,745}$	270,0	38,0	7,10	7,21
		225,0	31,5	7,21	
		148,0	20,0	7,35	
		70,5	10,0	7,05	

Tableau n° 5 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Morphine	$\int_{10,05}^{11,10}$	82,0	40,0	2,04	1,95
		59,0	30,0	1,96	
		39,5	20,8	1,91	
		18,0	10,0	1,83	
	$\int_{12,16}^{13,55}$	107,5	40,0	2,68	2,61
		79,0	30,0	2,63	
		53,0	20,5	2,55	
		24,5	10,0	2,49	
α-Narcotine	$\int_{7,48}^{8,11}$	131,0	42,5	3,10	3,15
		101,0	32,0	3,16	
		65,0	21,0	3,11	
		36,0	10,5	3,44	
	$\int_{9,06}^{10,12}$	249,0	42,5	5,86	5,93
		188,5	32,0	5,90	
		123,0	21,0	5,83	
		67,5	10,5	6,40	

Tableau n° 5 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Papavérine	$\int_{7,49}^{8,21}$	165,0	39,0	4,24	4,04
		120,5	30,0	4,02	
		79,0	19,5	4,03	
		37,5	10,0	3,90	
Quinine	$\int_{7,75}^{8,45}$	66,0	20,5	3,22	3,36
		36,0	10,0	3,60	
		16,5	5,0	3,30	
Strychnine	$\int_{12,55}^{13,60}$	85,0	40,0	2,01	2,16
		65,5	29,5	2,22	
		42,5	20,0	2,13	
		18,0	10,0	1,80	

Tableau n° 6

Courbes de référence des psycholeptiques et des psychoanaleptiques

Micropastilles préparées par évaporation de solutions acétoniques dans des microcupules de bromure de potassium

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Amobarbital	$\int_{7,95}^{8,45}$	54,0	42,0	1,29	1,34
		40,0	30,0	1,33	
		25,5	21,0	1,20	
		14,0	10,0	1,39	
Barbital	$\int_{7,90}^{8,40}$	81,0	42,5	1,91	1,77
		61,5	34,0	1,79	
		35,0	21,0	1,66	
		20,0	10,0	2,12	

Tableau n° 6 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I. 10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Chlordiazépoxide	$\int_{6,63}^{7,30}$	77,0	41,0	1,86	1,83
		55,0	31,0	1,75	
		37,0	20,5	1,80	
		18,0	10,5	1,74	
	$\int_{7,55}^{8,34}$	63,5	41,0	1,51	1,47
		44,0	31,0	1,41	
		29,5	20,5	1,44	
		14,5	10,0	1,42	
	$\int_{12,70}^{13,45}$	44,0	41,0	1,07	1,02
		30,0	31,0	0,97	
		20,0	20,5	0,98	
		9,5	10,0	0,95	

Tableau n° 6 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Diazepam	$\int_{11,60}^{12,55}$	78,0	41,5	1,86	1,79
		53,0	32,0	1,68	
		33,0	21,0	1,56	
		20,0	10,0	1,97	
	$\int_{13,25}^{13,75}$	42,5	41,5	1,02	1,03
		32,5	32,0	1,03	
		21,0	21,0	1,01	
		11,5	10,0	1,13	
Glutéthimide	$\int_{8,10}^{8,80}$	148,0	42,5	3,48	3,48
		106,5	32,5	3,37	
		69,0	20,0	3,49	
		33,0	10,0	3,25	
	$\int_{12,70}^{13,50}$	46,0	42,5	1,08	1,06
		33,0	31,5	1,04	
		19,5	19,5	1,00	
		10,0	10,0	0,97	

Tableau n° 6 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Imipramine	$\int_{6,47}^{7,02}$	95,0	39,5	2,41	2,41
		69,0	28,0	2,45	
		47,0	19,5	2,39	
		23,0	10,0	2,29	
	$\int_{12,50}^{13,70}$	161,0	39,5	4,05	4,07
		115,0	28,0	4,10	
		79,0	19,5	4,04	
		39,5	10,0	3,90	
Méprobamate	$\int_{9,00}^{9,85}$	174,0	41,0	4,23	4,25
		127,5	30,0	4,24	
		85,0	20,0	4,20	
		44,0	10,0	4,38	
	$\int_{12,40}^{13,10}$	33,0	41,0	0,80	0,805
		24,5	30,0	0,81	
		16,5	20,0	0,81	
		10,0	10,0	0,97	

Tableau n° 6 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Nialamide	$\int_{6,32}^{6.73}$	101,5	42,5	2,40	2,44
		79,0	32,0	2,47	
		52,5	22,0	2,38	
		34,0	10,5	2,54	
	$\int_{12,90}^{14,00}$	59,0	42,5	1,39	1,41
		44,5	32,0	1,38	
		31,5	22,0	1,41	
		16,5	10,5	1,58	
	$\int_{14,00}^{14,65}$	57,0	42,5	1,34	1,34
		42,5	32,0	1,35	
		29,5	22,0	1,34	
		13,5	10,5	1,34	
Phénobarbital	$\int_{7,90}^{8,50}$	59,0	43,0	1,36	1,33
		42,5	32,0	1,33	
		26,0	19,0	1,36	
		13,0	10,5	1,25	

Tableau n° 7

Comparaison des courbes de référence établies par mélange en milieu solide et par évaporation de solutions acétoniques dans des microcupules de bromure de potassium

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Pente moyenne de la courbe de référence en U.A.I. 10^{-2} /µg				Test t
		Mélange en milieu solide		Evaporation de solutions acétoniques		
		m	σ^2	m	σ^2	
Aconitine	$\int_{7,41}^{8,14}$	3,59	0,0093	3,24	0,0035	4,80
	$\int_{8,73}^{9,41}$	4,67	0,061	4,33	0,0128	1,47
Cocaïne	$\int_{7,61}^{8,02}$	2,87	0,0185	2,50	0,0085	3,3
Codéine	$\int_{12,30}^{12,90}$	1,03	0,0005	1,11	0,0007	4,6

Tableau n° 7 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - μ -	Pente moyenne de la courbe de référence en U.A.I. 10^{-2}/ μg				test t
		Mélange en milieu solide		Evaporation de solutions acétoniques		
		m	σ^2	m	σ^2	
Colchicine	$\int_{7,64}^{8,23}$	2,41	0,1067	2,71	0,0152	5,45
Diamorphine	$\int_{5,51}^{5,90}$	1,96	0,0133	2,10	0,0070	1,97
	$\int_{7;630}^{8,745}$	7,20	0,0277	7,17	0,0177	0,35
Papavérine	$\int_{7,49}^{8,21}$	4,27	0,0062	4,05	0,0187	2.80
Strychnine	$\int_{12,55}^{13,60}$	1,94	0,007	2,04	0,0330	1,09

Les valeurs de t supérieures à 2,5 indiquent l'existence d'une différence significative avec une probabilité de 95 p. 100

Tableau n° 8

Quantités d'alcaloïde retrouvées après élution d'un spot sur silice

(Courbes de référence établies par évaporation de solutions acétoniques)

(dans des microcupules de bromure de potassium)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg - théorique	Poids de toxique dans la micropastille - µg - trouvé	Différence p. 100
Aconitine	[8,14 7,41	134,5	42,0	40,5	- 3,6
		97,0	30,5	29,5	- 3,3
		64,5	21,0	19,5	- 7,1
		33,0	10,0	10,0	- 3,0
	[9,41 8,73	174,0	42,0	40,0	- 4,8
		125,0	30,5	29,0	- 4,9
		83,5	21,0	19,5	- 7,0
		40,0	10,0	9,0	- 10,0
Atropine	[14,70 14,00	29,5	39,5	24,5	- 38,0
		24,5	31,0	20,5	- 34,0
		13,5	18,5	11,0	- 40,0
		8,0	10,0	6,5	- 45,0

Tableau n° 8 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg - théorique	Poids de toxique dans la micropastille - µg - trouvé	Différence p. 100
Brucine	$\int_{7,48}^{8,63}$	113,0	40,0	33,0	- 17,5
		90,0	31,5	26,0	- 17,2
		61,5	20,5	18,0	- 11,3
		27,0	10,0	8,0	- 20,0
	$\int_{8,63}^{9,39}$	64,0	40,0	34,0	- 15,7
		51,5	31,5	26,5	- 15,8
		36,5	20,5	19,0	- 6,4
		17,0	10,0	9,0	- 13,0
Cocaïne	$\int_{7,61}^{8,02}$	105,0	40,0	40,0	0,0
		77,0	32,5	32,5	0,0
		48,5	20,0	19,0	- 5,3
		30,5	10,0	10,5	+ 5,0
Codéine	$\int_{12,30}^{12,90}$	44,5	43,0	40,5	- 6,5
		37,0	32,5	33,5	+ 4,1
		23,5	21,0	21,5	+ 2,5
		13,5	10,5	12,5	+ 18,4

Tableau n° 8 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -		Différence p. 100
			théorique	trouvé	
Colchicine	[8,23 7,64	95,0	40,5	36,0	- 11,2
		84,5	31,5	31,0	- 1,6
		45,0	21,0	16,5	- 20,6
		24,0	10,5	8,5	- 17,5
Diamorphine	[5,90 5,51	97,0	40,5	46,0	+ 13,5
		59,0	32,0	28,5	- 13,3
		41,0	21,0	19,5	- 6,5
		18,5	10,0	9,0	- 10,0
	[8,745 7,630	270,0	40,5	37,5	- 7,5
		192,0	32,0	27,0	- 16,3
		144,0	21,0	20,0	- 4,1
		61,5	10,0	9,0	- 13,5

Tableau n° 8 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg - théorique	Poids de toxique dans la micropastille - µg - trouvé	Différence p. 100
Morphine	$\int_{10,05}^{11,10}$	64,0	40,0	32,5	- 19,0
		47,0	32,0	24,0	- 23,0
		33,0	20,0	16,5	- 17,5
		20,5	10,0	9,5	- 2,4
	$\int_{12,16}^{13,55}$	95,0	40,0	36,0	- 10,0
		65,5	32,0	25,0	- 21,8
		46,0	20,0	17,5	- 12,5
		23,0	10,0	9,0	- 10,0
α-Narcotine	$\int_{7,48}^{8,11}$	122,0	41,5	39,5	- 5,1
		86,5	31,5	27,5	- 12,2
		61,0	22,0	19,5	- 11,8
		34,5	11,0	11,0	+ 2,3
	$\int_{9,06}^{10,12}$	226,0	41,5	38,5	- 7,5
		154,0	31,5	31,5	- 0,3
		128,0	22,0	22,0	- 0,3
		68,5	11,0	11,5	+ 6,6

Tableau n° 8 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg - théorique	Poids de toxique dans la micropastille - µg - trouvé	Différence p. 100
Papavérine	$\int_{7,49}^{8,21}$	167,0	40,0	42,0	+ 7,0
		122,0	30,0	30,5	+ 6,0
		82,0	20,5	20,5	0,0
		39,0	10,0	9,5	- 1,5
Quinine	$\int_{7,75}^{8,45}$	105,0	33,0	31,5	- 4,5
		64,0	20,0	19,0	- 5,0
		36,0	10,5	11,0	+ 4,7
		19,5	5,5	6,0	+ 9,0
Strychnine	$\int_{12,55}^{13,60}$	84,0	41,0	39,5	- 3,5
		63,0	30,5	35,0	+ 16,5
		45,0	20,0	20,5	+ 2,5
		17,5	10,0	8,0	- 22,5

Tableau n° 9

Quantités de psycholeptique et de psychoanaleptique retrouvées après élution d'un spot sur silice

(Courbes de référence établies par évaporation de solutions acétoniques)

(dans des microcupules de bromure de potassium)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -		Différence p. 100
			théorique	trouvé	
Amobarbital	$\int_{7,95}^{8,45}$	48,0	41,5	36,0	- 13,2
		31,0	29,0	24,5	- 19,0
		23,0	20,0	17,5	- 12,5
		10,0	9,5	7,5	- 21,0
Barbital	$\int_{7,90}^{8,40}$	69,0	40,0	37,5	- 7,0
		54,0	30,0	29,0	- 3,0
		37,5	21,0	19,5	- 8,0
		20,0	12,0	10,0	- 18,0
Chlordiazepoxide	$\int_{12,70}^{13,45}$	39,0	41,0	37,5	- 8,5
		28,0	29,5	27,0	- 8,5
		18,5	20,5	17,5	- 14,5
		10,0	10,0	9,0	- 10,0

Tableau n° 9 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I/10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg - théorique	Poids de toxique dans la micropastille - µg - trouvé	Différence p. 100
Diazepam	$\int_{11,68}^{12,55}$	72,5	41,5	40,5	- 2,5
		52,0	30,5	28,5	- 6,5
		28,0	22,0	20,0	- 9,6
		16,5	10,0	8,5	- 15,0
	$\int_{13,25}^{13,75}$	39,0	41,5	37,5	- 9,2
		29,5	30,5	29,0	- 4,3
		25,0	22,0	23,0	+ 6,0
		11,5	10,0	11,0	+ 10,6
	$\int_{14,00}^{14,80}$	88,5	41,5	39,5	- 4,3
		67,0	30,5	30,5	- 0,0
		56,5	22,0	20,0	- 9,6
		26,0	10,0	9,0	- 7,5
Glutéthimide	$\int_{8,10}^{8,80}$	142,0	42,0	40,5	- 2,9
		105,0	31,5	30,0	- 6,2
		69,0	21,0	19,5	- 6,5
		33,0	10,0	9,5	- 7,0
	$\int_{12,70}^{13,50}$	42,5	42,0	40,5	- 2,9
		31,0	31,5	29,0	- 7,9
		21,0	21,0	19,0	- 9,5
		10,0	10,0	9,0	- 11,8

Tableau n° 9 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg - théorique	Poids de toxique dans la micropastille - µg - trouvé	Différence p. 100
Imipramine	$\int_{6,47}^{7,02}$	69,0	41,0	28,0	- 31,5
		52,5	30,0	21,5	- 28,0
		36,0	20,0	15,0	- 25,0
		19,0	10,5	7,5	- 29,0
	$\int_{12,50}^{13,70}$	119,5	41,0	30,0	- 28,0
		87,0	30,0	21,0	- 29,0
		59,0	20,0	14,5	- 27,0
		28,0	10,5	7,0	- 34,0
Méprobamate	$\int_{9,00}^{9,85}$	174,0	41,5	40,5	- 2,7
		129,0	30,5	29,5	- 2,4
		85,5	20,5	20,0	- 2,4
		38,0	10,0	9,5	- 5,0
	$\int_{12,40}^{13,10}$	33,0	41,5	40,5	- 2,7
		21,0	30,5	27,5	- 10,2
		15,0	20,5	19,0	- 10,2
		10,0	10,0	10,5	+ 2,5

Tableau n° 9 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg - théorique	Poids de toxique dans la micropastille - µg - trouvé	Différence p. 100
Nialamide	$\int_{6,32}^{6,73}$	59,0	45,5	44,5	- 46,2
		46,0	34,0	18,5	- 44,7
		29,5	22,0	12,5	- 45,5
		10,0	11,0	4,0	- 65,2
	$\int_{12,90}^{14,00}$	43,0	45,5	30,0	- 33,3
		30,0	34,0	20,0	- 41,2
		20,0	22,0	13,5	- 38,6
		10,0	11,0	6,0	- 45,4
	$\int_{14,00}^{14,65}$	24,5	45,5	19,0	- 59,0
		19,5	34,0	15,0	- 55,8
		13,0	22,0	10,5	- 52,2
		7,0	11,0	11,0	- 53,8
Phénobarbital	$\int_{7,90}^{8,50}$	41,0	31,5	31,5	- 0.0
		26,0	21,0	19,5	- 7,0
		12,0	10,2	8,5	- 16,0

Tableau n° 10

Moyenne des valeurs absolues des erreurs commises

sur la détermination de quatre quantités d'alcaloïde

Nature du toxique	Zone d'intégration - μ -	Moyenne des valeurs absolues des erreurs p. 100
Cocaïne	$\int_{7,61}^{8,02}$	2,5
Papavérine	$\int_{7,49}^{8,21}$	3,6
α-Narcotine	$\int_{9,06}^{10,12}$	3,6
Aconitine	$\int_{7,41}^{8,14}$	4,2
Aconitine	$\int_{8,73}^{9,41}$	6,6
Codéine	$\int_{12,30}^{12,90}$	7,8
α-Narcotine	$\int_{7,48}^{8,11}$	7,8

Tableau n° 10 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Moyenne des valeurs absolues des erreurs p. 100
Diamorphine	$\int_{7,630}^{8,745}$	10,3
Diamorphine	$\int_{5,51}^{5,90}$	10,8
Strychnine	$\int_{12,55}^{13,60}$	11,2
Brucine	$\int_{8,63}^{9,39}$	12,6
Colchicine	$\int_{7,64}^{8,23}$	12,7
Morphine	$\int_{12,16}^{13,55}$	13,5
Morphine	$\int_{10,05}^{11,10}$	15,4
Brucine	$\int_{7,48}^{8,63}$	16,5

Tableau n° 11

Moyenne des valeurs absolues des erreurs commises sur la détermination de quatre quantités de psycholeptique ou de psychoanaleptique

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Moyenne des valeurs absolues des erreurs p. 100
Méprobamate	$\int_{9,00}^{9,85}$	3,1
Phénobarbital	$\int_{7,90}^{8,50}$	3,2
Diazepam	$\int_{14,00}^{14,80}$	4,3
Glutéthimide	$\int_{8,10}^{8,80}$	5,6
Méprobamate	$\int_{12,40}^{13,10}$	6,4
Chlordiazepoxide	$\int_{12,70}^{13,45}$	6,5
Diazepam	$\int_{11,60}^{12,55}$	7,4

Tableau n° 11 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Moyenne des valeurs absolues des erreurs p. 100
Diazepam	$\int_{13,25}^{13,75}$	7,5
Glutéthimide	$\int_{12,70}^{13,50}$	8,0
Barbital	$\int_{7,90}^{8,40}$	9,0
Amobarbital	$\int_{7,95}^{8,45}$	16,4
Imipramine	$\int_{6,47}^{7,02}$	28,3
Imipramine	$\int_{12,50}^{13,70}$	29,5
Nialamide	$\int_{12,90}^{14,00}$	39,6
Nialamide	$\int_{6,32}^{6,73}$	50,4
Nialamide	$\int_{14,00}^{14,65}$	55,2

Tableau n° 12

Courbes de référence des alcaloïdes

Micropastilles préparées par évaporation d'éluats de spots sur silice dans des microcupules de bromure de potassium

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Atropine	$\int_{14,00}^{14,70}$	29,5	39,5	0,75	0,76
		24,5	31,0	0,79	
		13,5	18,5	0,73	
		8,0	10,0	0,80	
Brucine	$\int_{7,48}^{8,63}$	113,0	40,0	2,80	2,89
		90,0	31,5	2,86	
		61,5	20,5	3,00	
		27,0	10,0	2,70	
Codéine	$\int_{12,30}^{12,90}$	44,5	43,0	1,04	1,07
		37,0	32,5	1,14	
		23,5	21,0	1,12	
		13,5	10,5	1,28	

Tableau n° 12 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µ g -	Pente de la courbe de référence U.A.I. $10^{-2}/\mu g$	
				calculée	mesurée sur le graphique
Morphine	$\int_{10,05}^{11,10}$	64,0	40,0	1,61	1,57
		47,0	32,0	1,47	
		33,0	20,0	1,65	
		20,5	10,0	2,05	
	$\int_{12,16}^{13,55}$	95,0	40,0	2,38	2,27
		65,5	32,0	2,03	
		46,0	20,0	2,04	
		23,0	10,0	2,30	
Strychnine	$\int_{12,55}^{13,60}$	84,0	41,0	2,05	2,07
		63,0	30,5	2,06	
		45,0	20,0	2,25	
		17,5	10,0	1,75	

Tableau n° 13

Courbes de référence des psycholeptiques et des psychoanaleptiques

Micropastilles préparées par évaporation d'éluats de spots sur silice dans des microcupules de bromure de potassium

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Amobarbital	8,45 / 7,95	48,0	41,5	1,16	1,125
		31,0	29,0	1,07	
		23,0	20,0	1,15	
		10,0	9,5	1,06	
Barbital	8,40 / 7,90	69,0	40,0	1,72	1,76
		54,0	30,0	1,80	
		37,5	21,0	1,78	
		20,0	12,0	1,67	
	13,70 / 13,35	46,0	40,0	1,14	1,10
		30,0	30,0	1,04	
		21,0	21,0	1,07	
		13,0	12,0	1,11	

Tableau n° 13 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Diazepam	14,80 / 14,00	86	41,5	2,10	2,25
		67,0	30,5	2,20	
		56,5	22,0	2,50	
		26,0	10,0	2,60	
Glutéthimide	8,80 / 8,10	142,0	42,0	3,38	3,33
		105,0	31,5	3,33	
		69,0	21,0	3,29	
		33,0	10,0	3,30	
	13,50 / 12,70	42,5	42,0	1,01	1,00
		31,0	31,5	0,99	
		21,0	21,0	1,00	
		10,0	10,0	1,00	
Imipramine	7,02 / 6,47	69,0	41,0	1,68	1,82
		52,5	30,0	1,75	
		36,0	20,0	1,80	
		19,0	10,5	1,80	
	13,70 / 12,55	119,5	41,0	2,92	2,98
		87,0	30,0	2,91	
		59,0	20,0	2,95	
		28,0	10,5	2,67	

Tableau n° 13 (suite)

Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Absorbance intégrée U.A.I.10^{-2}	Poids de toxique dans la micropastille - µg -	Pente de la courbe de référence U.A.I. 10^{-2}/µg	
				calculée	mesurée sur le graphique
Nialamide	6,73 / 6,32	59,0	45,5	1,29	1,32
		46,0	34,0	1,35	
		29,5	22,0	1,34	
		10,0	11,0	0,91	
	14,00 / 12,90	43,0	45,5	0,95	0,90
		30,0	34,0	0,89	
		20,0	22,0	0,91	
		10,	11,0	0,91	
	14,65 / 14,00	24,5	45,5	0,55	0,57
		19,5	34,0	0,59	
		13,0	22,0	0,59	
		7,0	11,0	0,63	
Phénobarbital	8,50 / 7,90	41;0	31,5	1,30	1,28
		26,0	21,0	1,24	
		12,0	10,0	1,18	
	13,70 / 13,25	42,5	31,5	1,35	1,30
		31,5	21,0	1,35	
		13,0	10,0	1,30	

Tableau n° 14

Quantités de substances toxiques retrouvées dans un échantillon d'urine après extraction par le chloroforme

N°	Volume d'urine - ml -	Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Poids de toxique dans l'échantillon d'urine - µg -			Différence p. 100	
				théorique	méthode 1	méthode 2	méthode 1	méthode 2
1	50	Strychnine	$\int_{12,50}^{13,60}$	100	52,5	54,5	- 47,5	- 45,5
2	50	Strychnine	$\int_{12,50}^{13,60}$	100	47,0	49,0	- 53,0	- 51,0
3	50	Strychnine	$\int_{12,50}^{13,60}$	200	86,5	94,0	- 56,5	- 53,0

Méthode 1 : résultats rapportés à une courbe de référence établie par évaporation de solutions acétoniques dans les microcupules de bromure de potassium

Méthode 2 : résultats rapportés à une courbe de référence établie par élution de spots sur couche mince de silice.

Tableau n° 14 (suite)

N°	Volume d'urine - ml -	Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Poids de toxique dans l'échantillon d'urine - µg -			Différence p. 100	
				théorique	méthode 1	méthode 2	méthode 1	méthode 2
4	50	Diamorphine	$\int_{5,51}^{5,90}$	100	74,5	76,6	- 25,5	- 23,5
			$\int_{7,630}^{8,745}$	100	73,0	80,2	- 27,0	- 29,8
5	50	Codeine	$\int_{12,30}^{12,90}$	200	114,0	117,5	- 43,2	- 41,2
6	50	Codeine	$\int_{12,30}^{12,90}$	200	135,0	139,0	- 32,5	- 30,4
7	50	Codeine	$\int_{12,30}^{12,90}$	200	122,5	124,0	- 38,7	- 38,0

Tableau n° 14 (suite)

N°	Volume d'urine - ml -	Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Poids de toxique dans l'échantillon d'urine - µg -			Différence p. 100	
				théorique	méthode 1	méthode 2	méthode 1	méthode 2
8	10	Amobarbital	$\int_{7,45}^{8,45}$	200	74,0	88,0	- 63,0	- 56,0
		Barbital	$\int_{7,90}^{8,40}$	200	131,0	133,0	- 34,5	- 33,5
9	10	Amobarbital	$\int_{7,95}^{8,45}$	80	39,5	47,0	- 50,5	- 41,0
		Barbital	$\int_{7,90}^{8,40}$	80	30,3	32,2	- 63,0	- 61,0
			$\int_{13,25}^{13,70}$	80		27,4		- 65,0
		Glutéthémide	$\int_{8,10}^{8,80}$	200	124,0	128,5	- 38,0	- 36,0
			$\int_{12,70}^{13,54}$	200	127,5	137,0	- 36,0	- 31,0

Tableau n° 14 (suite)

N°	Volume d'urine - ml -	Nature du toxique	Zone d'intégration - µ -	Poids de toxique dans l'échantillon d'urine - µg -			Différence p. 100	
				théorique	méthode 1	méthode 2	méthode 1	méthode 2
10	10	Amobarbital	$\int_{7,95}^{8,45}$	100	64,3	74,2	- 48,0	- 38,0
		Barbital	$\int_{7,90}^{8,40}$	40	36,0	36,0	- 10,0	- 10,0
		Glutéthémide	$\int_{8,10}^{8,80}$	40	26,4	27,6	- 33,9	- 31,0
			$\int_{12,70}^{13,50}$	40	30,0	32,0	- 25,0	- 20,0
11	10	Amobarbital	$\int_{7,95}^{8,45}$	40	16,0	18,0	- 60	- 55,0
		Barbital	$\int_{7,90}^{8,40}$	200	111,0	111,5	- 44,5	- 44,2

BIBLIOGRAPHIE

OUVRAGES CITES

(1) BELLAMY L. J.

The infrared spectra of complex molecules,

METHUEN Ed., LONDON, 1960

(2) BRÜGEL W.

Einfuhrung in die ultrarotspecktroscopie,

Ed. anglaise, METHUEN Ed., LONDON, 1962, 234, Fig. 98

(3) BRÜGEL W.

- id - , 266

(4) BRÜGEL W.

- id - , 299

(5) HEYDEN A. L.

Laboratory methods in infrared spectroscopy,

MILLER Ed., LONDON, 1965

(6) LAWSON K. E.

Infrared Absorption of inorganic substances,

REINHOLD Pub. Co., NEW-YORK, 1961

(7) RANDERATH K.

Chromatographie sur couche mince,

Ed. Française, GAUTHIER-VILLARS, PARIS, 1964

(8) SADTLER RESEARCH LAB. INC.

Inorganics and Related Compounds, PHILADELPHIE, U.S.A., 1965 et 1967

(9) SADTLER RESEARCH LAB. INC.

Pharmaceutical Spectra, PHILADELPHIE, U.S.A., 1962 et 1966

(10) STEWART C. P. et STOLMAN A.

Toxicology, Vol. 1, ACADEMIC PRESS, NEW-YORK, 1960

(11) SZYMANSKI M. A.

Interprated infrared spectra, Vol. 1, 26, 28, 29

PLENUM PRESS, NEW-YORK, 1964

PUBLICATIONS ORIGINALES

(12) ALHA A.R. et TAMMINEN V.

Am. Med. Exp. Biol. Fenn., 1959, 37, 2, 157-174

(13) ARNAUD P.

Bull. Soc. Chem. Fr., 1961, 5, 1038

(14) BEYERMANN K.

Zeitg. Anal. Chemie, 1967, 228, 1

(15) BEYERMANN K. et RÖDER E.

Zeitg. Anal. Chemie, 1967, 230, 5, 347-355

(16) BONNICHSEN R., MAEHLY A. C. et NORLANDER S.
J. Chromatogr., 1960, 3, 190-192

(17) BOUVIER M.
Méth. Phys. Anal. (GAMS), 1965, 177-179

(18) BRANDENBERGER H.
Dtsch. Z. Ges. Med., 1966, 57, 1-2, 300-310

(19) Mac COY R. N. et FIEBIG E. C.
Anal. Chem. 1965, 37, 4, 593-595

(20) DORING G. et DOERING W.
Dtsch. Z. Ges. Med., 1966, 57, 1-2, 348-352

(21) FAHR E. NEUMANN W. P.
Angew. Chem. 1955, 67, 277

(22) GOENECHEA S.
Dtsch. Z. Ges. Med., 1967, 59, 2-3, 186-187

(23) LECONTE J.
Bull. Soc. Chem. Fr., 1959, 7-8, 1085

(24) LINFORS R. et RUDHONEN A.
Arch. Toxik., 1962, 19, 402-407

(25) MEBANE A. D.
Anal. Chem., 1959, 28, 37A

(26) MESTRES R., JAULMES P. et SABON F.
Ann. Med. Leg., XLVII, 3, 235-249

(27) MONTIGNY P.
Méth. Phys. Anal., (GAMS), 1963, 2, 71-86

(28) PIRLOT G.
Anal. Chim. Acta., 1948, 2, 744

(29) PIRLOT G.
Bull. Soc. Chem. Belg., 1949, 58, 28

(30) PRIMAS H. et GUNTHARD H. H.
Helv. Chim. Acta., 1954, 37, 380

(31) SANTOS A. S., MARQUES M. C. et RALHA A.
Rev. Prot. Farm., 1965, 15, 363

(32) SCHIEDT U. et REINWEIN H.

Zeitg. Natur., 1952, 78, 270

(33) SCHWARTZ H. P. et coll.

Appl. Spectr., 1958, 12, 35

(34) SPARAGANA L. et MASON W. B.

Anal. Chem., 1962, 34, 242

(35) STERLING

Anal. Chem., 1966, 36, 12, 1804

(36) STIMSON M. M. et O'DONNELL M. J.

J. Amer. Chem. Soc., 1952, 74, 1805

(37) TAMMINEN V. et ALHA A. R.

Suom. Kemistilehti, 1949, 32, 119-121

(38) VOLKMANN H.

Notes techniques de Laboratoire infrarouge, ERNST LEITZ

1962, n° 7

(39) WRIGHT N.

Ind. Eng. Chem. Anal., 1941, 13, 1

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

I - GENERALITES SUR LES SPECTRES INFRA-ROUGES 4

1 - SPECIFICITE 5

2 - FIDELITE 7

3 - SENSIBILITE 8

II - APPLICATIONS DE LA SPECTROMETRIE INFRA-ROUGE A L'ANALYSE TOXICOLOGIQUE. 11

1 - EXPOSE DES METHODES 11

2 - DISCUSSION DES METHODES 14

A - En phase liquide 14

B - En phase solide 16

Pages

III - METHODE PROPOSEE 18

1 - PRINCIPE 18

2 - MATERIEL UTILISE 23

A - Spectromètre infrarouge 24

B - Dispositif d'élution des spots 25

C - Moule de fabrication des microcupules 26

D - Dispositif d'évaporation des éluats 26

E - Dispositif de préparation des micropastilles 27

3 - MODE OPERATOIRE 27

A - Préparation des plaques de chromatographie 28

B - Révélation et repérage des spots 29

C - Elution des spots 31

D - Evaporation des éluats dans les microcupules 31

E - Préparation des micropastilles 32

F - Mesures spectrométriques 33

a - conditions opératoires 33

b - identification des toxiques 35

c - dosage des toxiques 37

d - préparation des courbes de références 38

Pages

IV - DISCUSSION DE LA METHODE PROPOSEE 40

1 - ELUTION DES SPOTS SUR LES CHROMATOGRAMMES 41

2 - TRANSFERT QUANTITATIF DES TOXIQUES SUR LE BROMURE DE POTASSIUM 43

3 - IDENTIFICATION DES TOXIQUES A PARTIR DES SPECTRES 45

4 - DOSAGE DES TOXIQUES 46

A - Choix de la bande clé 46

B - Mode d'expression des absorbances 48

C - Sensibilité de la méthode 51

D - Précision de la méthode 52

a - erreur due à l'emploi des micropastilles 53

b - erreur provenant de l'évaporation des éluats 55

c - erreur provenant de l'élution des spots 56

V - APPLICATION DE LA METHODE PROPOSEE A L'IDENTIFICATION ET AU DOSAGE DE QUELQUES TOXIQUES DANS L'URINE. 59

CONCLUSION 62

ANNEXE I Figures 65

ANNEXE II Tableaux 87

BIBLIOGRAPHIE 132

Vu, le Président de Thèse.

Nantes le 25 mars 1968

Vu, le Doyen de la Faculté.

Vu et permis d'imprimer.
Le Recteur de l'Académie de NANTES.
EX. SC. B. n° 517

Nantes, le 16 AVR. 1968

Le Recteur,

ACADÉMIE DE NANTES